Série : E
N° d'ordre : 33

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Mlle ARISTIE DAMBOVICEANU

Chef de la Section de Chimie biologique à l'Institut des Sérums et Vaccins de Bucarest

---

1re THÈSE. — COMPOSITION CHIMIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DU LIQUIDE CAVITAIRE CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES. PHYSIOLOGIE DE LA CALCIFICATION.

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 24 juin 1932 devant la Commission d'examen

MM. TERROINE.... *Président.*
CHATTON..... } *Examinateurs.*
BONNET..... }

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VIe)
1932

Série : E
N° d'ordre : 33

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Mlle ARISTIE DAMBOVICEANU

Chef de la Section de Chimie biologique à l'Institut
des Sérums et Vaccins de Bucarest

1re THÈSE. — COMPOSITION CHIMIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DU LIQUIDE CAVITAIRE CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES. PHYSIOLOGIE DE LA CALCIFICATION.

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 24 juin 1932 devant la Commission d'examen

MM. TERROINE.... *Président.*
CHATTON..... } *Examinateurs.*
BONNET..... }

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VIe)
1932

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen ..... E. ROTHÉ, Professeur de Physique du Globe.

Doyens honoraires ... E. BATAILLON, P.-Th. MULLER.

Professeurs honoraires. FRÉCHET, G. FRIEDEL, GAULT, GIGNOUX, H. VILLAT.

Professeurs

G. VALIRON	Analyse supérieure.
P. WEISS	Physique générale.
H. OLLIVIER	Physique générale.
L. HACKSPILL	Chimie minérale.
E. TOPSENT	Zoologie et anatomie comparée.
C. HOUARD	Botanique.
E. TERROINE	Physiologie générale.
J. DE LAPPARENT ..	Minéralogie et Pétrographie.
E. CHATTON	Biologie générale.
R. THIRY	Mécanique rationnelle.
G. CERF	Calcul différentiel et intégral.
G. DUBOIS	Géologie et Paléontologie.
G. RIBAUD	Physique expérimentale.
P. FLAMANT	Mathématiques générales.
E. CORNEC	Chimie générale.
N...	Chimie organique.
A. DANJON	Astronomie.
P. DE BEAUCHAMP..	Biologie générale.
L. BOUNOURE	Zoologie.
G. FOEX	Physique générale.
H. CHERMEZON	Botanique.
G. REMPP.	Physique du Globe.
R. ROMANN	Chimie physique et électrochimie.
J. LACOSTE	Physique du Globe.
H. MILLOUX	Mathématiques.

Maîtres de conférences

CH. STAEHLING	Chimie appliquée.
G. HUGEL	Chimie du Pétrole.
H. WEISS	Physico-chimie du Pétrole.
P. SOLEILLET	Physique mathématique.
R. BONNET	Physique et chimie biologiques.
J. JUNG	Géologie du Pétrole.
A. ROUSSEL	Mathématiques générales.
A. CHRÉTIEN.....	Chimie appliquée.
J. MARESQUELLE ..	Botanique.
H. CARTAN	Mathématiques.
N...	Minéralogie.

Secrétaire G. CUVIER.

A MES MAITRES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN CANTACUZÈNE,

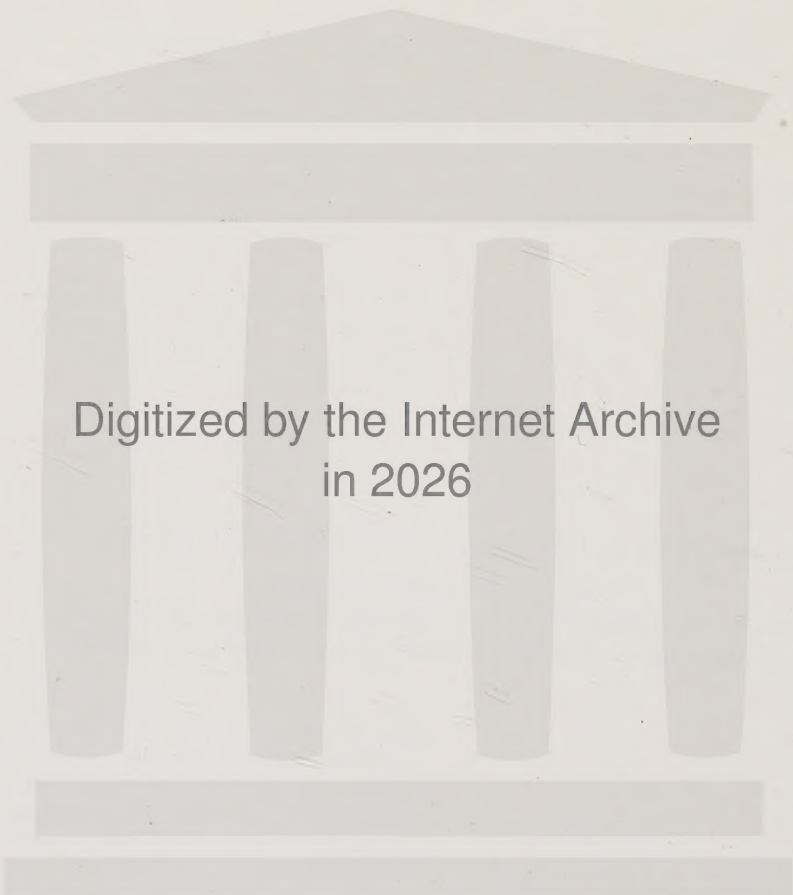
Membre correspondant de l'Académie des Sciences,
Membre associé de l'Académie de Médecine,
Grand officier de la Légion d'Honneur,
Professeur de Médecine Expérimentale à la Faculté de Médecine de Bucarest,
Directeur de l'Institut de Sérums et de Vaccins de Bucarest,

qui a été pour moi, en toutes circonstances, un maître incomparable, l'expression émue de la plus vive reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR C. IONESCO-MIHAIESTI,

Chevalier de la Légion d'Honneur,
Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine de Bucarest,
Sous-Directeur de l'Institut de Sérums et de Vaccins de Bucarest,

qui, par ses conseils, a largement contribué à ma formation intellectuelle, et qui m'a prodigué sans cesse les marques d'une bienveillance jamais démentie, témoignage de vive reconnaissance.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548008_0017

A Monsieur le Professeur Emile-F. TERROINE,

Directeur de l'Institut de Physiologie générale de la Faculté des Sciences de Strasbourg,

qui m'a fait le grand honneur de bien vouloir accepter la présidence de cette thèse et qui a accueilli mon travail avec beaucoup de bienveillance, l'expression de ma vive gratitude.

A mon Jury de Thèse

je dédie ce travail.

A. D.

COMPOSITION CHIMIQUE & PHYSICO-CHIMIQUE DU LIQUIDE CAVITAIRE CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES

PHYSIOLOGIE DE LA CALCIFICATION

INTRODUCTION

La notion de l'immunité a dû se présenter à l'esprit humain aussitôt qu'est devenue évidente la possibilité pour certains organismes vivants de guérir spontanément et même de résister à telle ou telle maladie contagieuse.

Malgré son ancienneté, l'immunologie ne sort d'un certain état d'empirisme qu'à la suite des observations de Jenner et de leur application à la vaccination antivariolique; elle ne devient une science exacte qu'après les admirables découvertes de Pasteur sur l'atténuation des microbes pathogènes. Orientée au début vers la pratique médicale, elle permet à la médecine de combattre avec éclat la maladie et la mort par l'emploi des sérums et des vaccins dans la prophylaxie des maladies contagieuses.

Mais lorsque l'on reconnaît l'importance de l'application des réactions d'immunité dans les phénomènes de biologie générale, ainsi que dans ceux de chimie biologique et colloïdale, l'intérêt suscité par cette science devient considérable.

Le nombre des travaux ayant pour but l'étude des principes fondamentaux d'immunologie augmente continuellement ; en mettant à contribution toutes les méthodes techniques dont disposent actuellement la chimie et la physico-chimie, les expéri-

mentateurs ont pu faire des observations des plus intéressantes.

Il a été prouvé qu'il existait une immunité chez les invertébrés, qu'il existait même une immunité chez les végétaux. On a constaté en plus que la spécificité des réactions d'immunité était due à la présence dans la composition des antigènes de certains polysaccharides. Isolés et débarrassés par purifications successives de toutes traces de protéines, ces *hydrates de carbone* appelés « antigène résiduel », sont capables de précipiter *in vitro* les anticorps respectifs. Par contre, inoculés à des animaux, ils ne déterminent l'apparition d'anticorps que s'ils sont injectés en même temps qu'une protéine quelconque.

Malgré les progrès réalisés, la nature des anticorps, ainsi que le mécanisme de certaines réactions d'immunité, restent des problèmes que les expérimentateurs sont encore loin d'avoir résolus.

C'est que l'on avait affaire d'un côté à l'être vivant, et, de l'autre, à des mélanges de complexité désespérante tels que les bactéries ou le sérum sanguin.

Il est permis d'espérer qu'en essayant d'étudier les réactions des organismes vivants plus simples, comme les invertébrés ou les végétaux vis-à-vis d'antigènes dont la composition serait mieux connue (mélanges de polysaccharides et de protéines purifiés), on pourrait pénétrer un peu plus avant dans la connaissance des principes fondamentaux de l'immunologie.

Le professeur J. Cantacuzène est un de ceux qui ont le plus contribué à préciser la nature des phénomènes d'immunité chez les invertébrés.

Chargé par la Société de Biologie de faire, à l'occasion de la célébration du soixante-quinzième anniversaire, un rapport sur le problème de l'immunité chez les invertébrés, il le termine de la manière suivante :

« L'intérêt très grand que présente l'étude de l'immunité chez les invertébrés, réside dans le fait que les actions d'anticorps semblent revêtir chez eux un caractère *plus imparfait et plus simple* que chez les mammifères, et aussi dans cette constatation qu'il règne, entre les différents groupes, une irrégularité et une inégalité, vraiment décevantes, dans la forme et l'intensité des réactions humorales vis-à-vis d'antigènes donnés.

« Il est permis d'espérer que l'analyse méthodique et minutieuse des conditions qui, chez ces espèces très voisines, accompagnent la présence ou l'absence (peut-être seulement apparente) des anticorps, contribuera puissamment à dégager l'essentiel des phénomènes d'immunité.

« *Mais, pour cela, il est indispensable de déterminer,* pour chaque cas particulier, *les constantes physico-chimiques normales du milieu intérieur* chez l'espèce étudiée. C'est ainsi qu'il y aurait le plus grand intérêt à pouvoir établir une corrélation entre la présence ou l'absence de certains constituants albuminoïdes du plasma, d'une part, et de l'autre, la présence ou l'absence de telle ou telle catégorie d'anticorps. Il y a là un travail préalable qui n'a été fait jusqu'ici que très imparfaitement et faute duquel l'effort expérimental risque de demeurer vain et stérile quant à la solution du problème que nous poursuivons. »

Nous avons cité ce passage *in extenso,* parce qu'il résume, mieux que nous n'aurions pu le faire, les motifs pour lesquels le professeur Cantacuzène nous a engagé à entreprendre l'étude chimique et physico-chimique du liquide cavitaire chez les invertébrés.

Quelques essais, ayant pour but de voir quelles étaient les réactions d'immunité chez les crustacés décapodes, avaient montré qu'on pouvait mettre en évidence, dans le sang des Maïas, une substance anti-complémentaire, de même que des agglutinines naturelles pour le bacille typhique et les globules rouges de mouton; à la suite de plusieurs injections immunisantes, le titre agglutinant du sang s'élevait nettement.

Le liquide cavitaire des crabes sacculinés contient des agglutinines et des précipitines pour une bouillie de sacculine externe traitée par l'alcool et reprise par une solution physiologique de Na Cl.

Le liquide cavitaire d'Eupagurus prideauxi possède un pouvoir neutralisant vis-à-vis du poison d'Adamsia.

Comme le sang des crustacés décapodes est généralement riche en substances protéiques; comme, malgré la découverte de l'antigène résiduel, le rôle des protéines reste incontestable dans les phénomènes d'immunité ; et comme enfin une première série de recherches nous avait permis de constater une élévation du taux des protéines dans le liquide cavitaire des siponcles immunisés (5 à 9 centigrammes %, siponcles normaux; 30 à 70 centigrammes %, siponcles immunisés), nous nous sommes proposé d'étudier les modifications physico-chimiques imprimées au liquide cavitaire des crustacés décapodes par certains états pathologiques et à la suite de plusieurs injections immunisantes.

Pour entreprendre cette étude, il était absolument indispensable d'établir quelle était la composition du liquide cavitaire des animaux à l'état normal et de voir ensuite si elle pouvait être

influencée par des états physiologiques aussi importants que la mue.

C'est l'Astacus fluviatilis qui nous a permis en premier lieu de faire les observations les plus complètes, grâce à la facilité de nous le procurer pendant tous les mois de l'année et de le garder assez longtemps en captivité au laboratoire. A la station biologique de Roscoff, nous avons eu l'occasion de compléter ces observations par l'étude d'autres espèces de crustacés sur le liquide cavitaire desquels nous avons déterminé quelques constantes et surtout le contenu en substances protéiques (Maïa squinado, Cancer pagurus, Palinurus vulgaris, Homarus vulgaris, Eupagurus prideauxi et Carcinus mænas).

Le professeur Cantacuzène est non seulement l'inspirateur de ce travail, mais au cours de nos recherches, il nous a constamment aidé par le grand intérêt qu'il porte toujours aux travaux faits sous sa direction, ainsi que par des conseils et des suggestions qui nous permettaient souvent de réaliser nos meilleures expériences. Nous le prions d'accepter, en même temps que nos remerciements reconnaissants, l'expression de notre dévouement, ainsi que de la plus profonde affection.

Qu'il nous soit permis d'adresser à M. Perez, le directeur de la station biologique de Roscoff, nos remerciements pour son aimable accueil. C'est grâce à sa bienveillance que nous avons eu la possibilité de faire, d'année en année, nos recherches dans de meilleures conditions techniques.

Au moment de grouper et d'exposer les résultats de nos recherches, nous nous rendons parfaitement compte des problèmes qui se posent encore, ainsi que des objections que l'on pourrait faire à certaines de nos expériences.

Pourtant, au point de vue qui nous intéressait spécialement, nous croyons avoir pu établir avec certitude qu'il est impossible d'entreprendre une étude des modifications de la composition du liquide cavitaire chez l'Astacus, à la suite de l'immunisation, sans tenir compte de l'état physiologique de l'animal au moment de l'expérience.

La mue *provoque chez l'Astacus et probablement chez tous les crustacés des changements profonds dans le métabolisme des différentes substances qui composent le liquide intérieur.* Des essais d'immunisation faits à cette époque (fin avril-fin septembre) pourraient conduire à des interprétations des plus erronées.

L'étude des conditions physiques et physico-chimiques qui

favorisent la consolidation de la nouvelle carapace, nous a permis, de plus, de constater que, pendant les 48-60 heures qui suivent la chute de la carapace, le sang acquiert *périodiquement* la propriété de précipiter le calcium *in vitro*. Le plasma des mammifères (chiens, lapins) en train de consolider une fracture osseuse quelconque, présente un phénomène analogue, bien que beaucoup moins évident. L'effet thérapeutique du sérum des convalescents (de fractures osseuses) dans le traitement des consolidations retardées, serait-il dû à l'apparition de ce pouvoir précipitant ? S'agit-il d'un ferment ? Quelques expériences préalables semblent confirmer cette hypothèse. Nous nous proposons d'essayer de résoudre ce problème par des recherches ultérieures et d'étudier en même temps la nature du précipité de calcium obtenu *in vitro*.

Ce mémoire sera composé de la manière suivante :

Première partie. — La coagulation chez les crustacés décapodes.

Deuxième partie. — Composition physico-chimique du liquide cavitaire normal chez les crustacés décapodes en dehors de la mue.

Troisième partie. — Variations provoquées par la mue.

Quatrième partie. — Contribution à l'étude du phénomène de la calcification. Essais d'interprétation du mécanisme de la calcification.

Note additionnelle. — Modification du liquide cavitaire chez l'Astacus après une saignée ou une inoculation avec un antigène quelconque, ainsi que chez les crabes parasités par la sacculine.

Conclusions.

Bibliographie.

PREMIÈRE PARTIE

LA COAGULATION CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES

La coagulation du sang chez les crustacés décapodes a attiré l'attention de nombreux expérimentateurs, parce que les animaux de ce groupe sont les premiers parmi les organismes vivants inférieurs qui présentent une prise en masse de leur liquide cavitaire parfaitement analogue à la coagulation du sang chez les mammifères. Cette question possède une riche bibliographie; nous ne mentionnerons que les travaux de Fredericq, Heim, Halliburton, Nolf, et dernièrement ceux de Loeb et de Tait qui, par leurs précieuses observations, ont réussi à établir les faits suivants :

Il existe, chez les crustacés décapodes, deux phases nettement distinctes dans le phénomène de la coagulation.

Première phase : prise en masse des éléments figurés du liquide intérieur. Cette agglutination est due à une substance (fibrine cellulaire) qui résulte de la destruction des cellules. Elle a pour résultat la mise en liberté d'un ferment qui, en agissant sur le fibrinogène soluble dans le plasma, provoque la *deuxième phase* de la coagulation, c'est-à-dire la gélification de toute la masse liquide.

Nous exposerons assez brièvement nos propres observations en n'insistant que sur les faits qui seront susceptibles de compléter les connaissances sur la coagulation du sang chez les crustacés décapodes.

Nos recherches ont toujours été faites sur le liquide provenant de la cavité générale. Pour l'obtenir, on ponctionnait, dans la majorité des cas, la base d'une des pattes de l'animal à l'aide d'une pipette Pasteur légèrement coudée. On pouvait recueillir de la sorte, suivant la taille de l'animal, de 2 à 3 centimètres cubes (Astacus) jusqu'à 100 à 150 cc. (Homard ou Langouste).

Pour saigner à blanc les animaux de petite taille, nous avons observé qu'il était préférable de ponctionner la membrane qui séparait la partie dorsale du thorax de la partie abdominale. Le liquide montait rapidement dans la pipette et permettait d'extraire en une seule fois la presque totalité du contenu de la cavité générale.

Astacus (fluviatilis).

En ponctionnant la membrane articulaire de la patte d'un Astacus de taille moyenne, on obtient environ 3 à 4 centimètres cubes d'un liquide opalescent, incolore ou à peine rosé. Il bleuit au contact de l'air et se trouble au bout de quelques secondes, en formant un voile qui se contracte peu à peu et prend l'aspect d'une masse spongieuse surnageant un liquide parfaitement limpide et légèrement bleuâtre. Le liquide séparé par centrifugation et décantation forme, suivant les cas, au bout de cinq à vingt minutes, un gel très peu rétractile qui laisse difficilement diffuser le sérum. L'Astacus présente donc les deux phases de la coagulation décrites par Loeb :

a) Altération et agglutination consécutive des éléments figurés;

b) Coagulation proprement dite, c'est-à-dire gélification et transsudation du sérum.

L'oxalate de potassium à 3/1000, le citrate de sodium à 3/1000, ainsi que le fluorure de sodium à 2/1000, empêchent la gélification du plasma, mais ne manifestent pas la moindre influence sur l'agglutination des éléments figurés.

Il n'en est pas de même lorsque l'on emploie le chloroforme ou le chlorhydrate de cocaïne. Le liquide intérieur des écrevisses, mélangé en parties égales avec une solution à 1 % de chlorhydrate de cocaïne, ne se trouble plus; les éléments figurés gardent leurs caractères morphologiques; ils restent arrondis, intacts, non agglutinés, en suspension dans le plasma ; au bout de quelque temps, ils se déposent au fond du vase. Le plasma légèrement opalescent, obtenu après décantation, reste *indéfiniment incoagulable*.

Si on lave le culot cellulaire avec une solution de Na Cl (0,75 %) qui contient 0,5 % de cocaïne, jusqu'à l'élimination des albumines du plasma, et si on le réémulsionne dans une solution physiologique pure, on constate que la suspension se trouble au bout de quelques secondes; les cellules, après avoir repris leur mobilité, émettent de nombreux pseudopodes asciculaires et

forment bientôt un amas spongieux pareil en tout à celui qui apparaît spontanément dans le liquide intérieur de l'Astacus après la saignée.

Cette expérience prouve que l'agglutination des éléments figurés est due à une substance que les cellules elles-mêmes mettent en liberté. D'ailleurs, elle a été décrite chez la majorité des invertébrés, et nous-même avons observé et décrit un phénomène parfaitement analogue chez l'Anodonta cyanœa, dont le liquide cavitaire est presque complètement dépourvu de substances protéiques.

Si on maintient un Astacus pendant trente minutes dans une atmosphère chargée de *vapeurs chloroformiques,* on observe après la saignée que le sang est devenu incoagulable, les éléments figurés se déposent sur le fond du vase. Le plasma séparé rapidement par centrifugation reste incoagulable.

L'héparine agit comme les anticoagulants salins, elle empêche la gélification du plasma sans influencer aucunement l'agglutination des éléments figurés.

Il ressort de ces recherches que le liquide intérieur de l'Astacus subit, après la sortie du corps : *une première modification* qui a pour résultat l'agglutination des éléments figurés en une petite masse spongieuse surnageant un liquide limpide coloré en bleu, phénomène presqu'immédiatement consécutif à la saignée, et une *deuxième modification* se produisant beaucoup plus tard, le plus souvent au bout de dix à vingt minutes, parfois même douze à vingt-quatre heures après la saignée. Elle a pour résultat visible la formation d'un gel très peu rétractile.

La coagulation de toute la masse sanguine ne peut avoir lieu si, par des anesthésiques comme la cocaïne ou le chloroforme, on empêche les éléments figurés d'éclater et de mettre en liberté une substance capable de précipiter le fibrinogène soluble dans le plasma. Comme chez les mammifères, l'immobilisation *des ions calcium,* par l'oxalate de potassium, empêche le fibrinogène d'être précipité de sa solution par le fibrine-ferment.

Le phénomène de la coagulation sanguine chez les crustacés décapodes supérieurs est donc parfaitement analogue à celui décrit chez les mammifères; pourtant, le fibrine-ferment sécrété par les cellules de l'Astacus est tout aussi inactif sur le plasma héparinisé de cheval que le fibrine-ferment du sérum de cheval sur le plasma héparinisé d'écrevisse.

Cette affirmation nous a été fournie par l'expérience suivante :

1° Plasma d'écrevisse héparinisé + extrait de broyage de muscle d'écrevisse = coagulation au bout de cinq minutes.

2° Plasma d'écrevisse héparinisé + extrait de broyage de muscle d'écrevisse chauffé à 100° (10 minutes) = pas de coagulation.

3° Plasma d'écrevisse héparinisé + sérum frais de cheval = absence de coagulation.

4° Plasma de cheval héparinisé + broyage de muscle d'écrevisse = absence de coagulation.

5° Plasma de cheval héparinisé + sérum frais de cheval = coagulation.

Palinurus vulgaris (Langouste).

Un animal de 1 1/2 à 2 kilos peut fournir, en une seule saignée, 120 à 150 centimètres cubes de liquide intérieur. Nettement coloré en rose orangé et trouble à la sortie du corps, il prend vite une teinte bleu violacé s'il est agité au contact de l'air. Deux à trois minutes après la saignée, on voit apparaître de gros flocons qui forment bientôt une masse compacte surnageant un liquide parfaitement limpide et coloré en bleu violacé. C'est la première phase de la coagulation semblable en tout à celle que nous avons décrite chez l'écrevisse. Quinze à vingt minutes plus tard, toute la masse sanguine forme un bloc gélifié très compact, sans la moindre trace de rétractilité. Pour obtenir du sérum, il faut broyer le caillot et le laisser s'égoutter sur un entonnoir. Le meilleur moyen d'obtenir du sérum est de défibriner le sang avec des perles de verre, immédiatement après la saignée, tout comme pour celui des mammifères.

Homarus vulgaris (Homard), Eupagurus prideauxi (Eupagure).

Le sang du homard, de même que celui de l'Eupagure, se comporte comme celui de la langouste. Ils présentent les deux phases de la coagulation du sang des crustacés, c'est-à-dire :

1° Altération et agglutination des éléments figurés;

2° Prise en masse consécutive du plasma et formation d'un gel très peu rétractile.

Maïa squinado.

Le liquide cavitaire est souvent incolore, parfois légèrement coloré en rose ou rose orangé, quelquefois opalescent, d'autres

fois trouble à la sortie du corps de l'animal. Comme le sang de l'Astacus, il présente la première phase de la coagulation, c'est-à-dire altération et agglutination des éléments figurés. Par contre, le liquide limpide, que surnage le caillot spongieux, ne présente pas de gélification en masse. Il nous est arrivé d'examiner parfois du sang de Maïa qui formait un gel presque fluide qu'il suffisait d'agiter pour en séparer le sérum.

PORTUNUS DEPURATOR (Crabe nageur).

Le sang des crabes nageurs est incolore chez les uns, coloré en jaune orangé chez les autres, parfois opalescent, d'autres fois trouble à la sortie du corps. Il bleuit s'il est agité en présence de l'air. Il présente la première phase de la coagulation du sang des crustacés décapodes; quant à la deuxième, elle est extrêmement réduite; on ne voit apparaître que de petites masses gélifiées qui adhèrent à la paroi du vase; au bout de vingt-quatre heures, on constate que tout le liquide forme une gelée demi-fluide qui laisse diffuser le sérum après une simple agitation et centrifugation.

CANCER PAGURUS (Tourteau).

Le liquide cavitaire est en général incolore ou légèrement coloré en rose, parfois opalescent, d'autres fois un peu trouble à la sortie du corps. Il ne présente que la première phase de la coagulation des crustacés décapodes.

CARCINUS MAENAS (Crabe).

Liquide cavitaire incolore ou rose, légèrement opalescent à la sortie du corps; il bleuit faiblement au contact de l'air. Il présente, comme chez tous les invertébrés, la première phase de la coagulation; quant à la deuxième, elle est réduite à une gélification partielle qui, parfois, se traduit par la formation de petits îlots gélifiés adhérant aux parois de verre.

En résumé, chez les *Décapodes Macroures* (Ecrevisse, Homard, Langouste, Eupagure), on distingue deux phases dans la coagulation du sang :

Première phase : destruction et agglutination des éléments figurés avec mise en liberté d'un fibrine-ferment.

Deuxième phase : gélification de toute la masse sanguine à la suite de la précipitation du fibrinogène dissous dans le plasma sous l'action du fibrine-ferment, en présence des sels de calcium.

Au moment de la mue, dans les heures qui précèdent et qui suivent immédiatement la chute de la carapace, on observe, à part les nombreuses modifications de la composition du liquide intérieur que nous décrirons dans un chapitre spécial, une augmentation considérable du pouvoir coagulant du sang. Pour pouvoir saigner un animal à ce moment, il faut aspirer son sang directement avec une pipette chargée d'un anticoagulant quelconque, sans cela il risque de boucher la pipette en coagulant presqu'instantanément sur les parois du verre.

A la même époque, le sang se colore fortement en rose orangé. Cette coloration semble être due à la mobilisation d'une partie du lipochrome de la vieille carapace qui est transporté par le liquide intérieur vers la nouvelle carapace.

Chez les *Crustacés Brachyoures* (Maïa, Crabe, Crabe nageur), c'est surtout *la première phase* de la coagulation *qui est évidente*; la *deuxième, extrêmement réduite,* ne se manifeste que par la formation d'îlots gélifiés adhérents aux parois du vase.

Pourtant, au moment de la mue, toute la masse sanguine forme une espèce de gelée demi-fluide qu'il suffit d'agiter pour en libérer le sérum. Il y a donc, chez eux aussi, une augmentation du pouvoir coagulant du liquide intérieur au moment de la mue. On observe en même temps une coloration intense en rose due, comme chez les Macroures, à là mobilisation du lipochrome accumulé dans l'ancienne carapace.

DEUXIÈME PARTIE

COMPOSITION DU LIQUIDE INTÉRIEUR CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES EN DEHORS DE LA MUE

Chapitre Premier

CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES

Les caractères physico-chimiques du liquide cavitaire chez les crustacés décapodes sont relativement peu connus. Bottazzi et Fredericq donnent, pour le delta du sang de quelques crustacés décapodes, les valeurs suivantes :

Carcinus Mænas	2,17
Maïa	2,13
Maïa Roscoff	2,07
Homard	2,29
Astacus	0,80

Ils constatent en plus que le résidu minéral du sang des animaux marins varie avec la composition saline du milieu ambiant. Fredericq a réussi à faire baisser le delta du sang de Maïa de 2,90 à 1,40, en baissant celui du milieu ambiant de 2,95 à 1,25. Ces modifications ne s'observent pas chez l'Astacus même s'il séjourne dans une eau très pauvre en sels (0,02 à 0,03). Bottazzi étudie la viscosité du liquide cavitaire de différents crustacés sans trouver des différences appréciables entre eux. Quant à la réaction du milieu, Heim dit avoir constaté que le sang des crustacés rougissait légèrement la phénolphtaléine. Bottazzi, par contre, affirme qu'il s'agissait d'une réaction alcaline au tournesol et acide à la phénolphtaléine.

Nos recherches, plus complètes pour l'Astacus, portent sur les constantes suivantes : *indice réfractométrique*, *p*H (méthode

colorimétrique et électrométrique), *delta cryoscopique, conductibilité électrique, viscosité et densité.*

Nous ne donnerons, pour les crustacés décapodes marins, que les constantes dont la détermination pouvait être réalisée avec les moyens techniques plus réduits dont nous disposions à la station biologique de Roscoff.

Les résultats de nos recherches, sur la composition physico-chimique du liquide intérieur chez les crustacés décapodes, sont résumés dans le tableau suivant :

	Indice réfracto-métrique		*p*H	Delta	Conductibilité électrique K. 18	Viscosité Hess
Astacus	(1,34199-1,34612)		7,77-7,83	-0,60	0,016003	1,2-1,45
Maïa	—	—	7,8 -7,9	-2,025	—	1,2-1,3
Carcinus Mænas.	—	—	7,6 -7,7	-2,08-2,10	—	1,35
Palinurus vulgar.	—	—	7,4	-2,29	—	1,5
Homarus	—	—	7,6 -7,7	-2,25	—	1,4
Eupag. prideauxi.	—	—	7,45	—	—	1,6
Portunus depur..	—	—	7,6 -7,7	-2,10	—	1,3
Cancer pagurus..	—	—	7,6 -7,7	-2,09	—	1,4

*p*H, eau de mer Roscoff..... 8,0-8-1
Delta, eau de mer Roscoff..... . 2,01

Chapitre II

LA COMPOSITION CHIMIQUE DU LIQUIDE CAVITAIRE CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES

a) Substances minérales :

Halliburton, Dohrn, Witting, Griesbach, Griffits, Heim, Gautrelet, ainsi que de nombreux auteurs, ont étudié les cendres du sang chez les crustacés décapodes. Comme les résultats que l'on trouve dans cette riche bibliographie sont parfois contradictoires, nous avons préféré reprendre l'étude du résidu minéral du liquide cavitaire chez l'écrevisse. Il était surtout intéressant de voir si, au moment de la mue, pendant la calcification de la nouvelle carapace et même pendant la formation des réserves calcaires, il ne se produisait pas un déséquilibre dans le métabolisme des différents ions du liquide intérieur.

Nous exposerons, dans un des chapitres suivants, quels sont ceux, parmi les constituants des cendres, qui semblent être le plus influencés par la mue; pour le moment, nous donnerons dans le tableau suivant les chiffres entre lesquels varie le taux

des différents éléments qui composent les cendres du sang de l'Astacus fluviatilis à l'état normal.

	Gr. % de sang défibriné
Eau	95,30 - 94,80
Cendres	1,5 - 1,6
Chlore	0,6 - 0,7
Soufre	0,020 - 0,021
Phosphore	0,015 - 0,017
Sodium	0,160 - 0,170
Potassium	0,002 - 0,003
Calcium	0,036 - 0,043
Magnésium	0,014 - 0,017
Fer	Traces - 0,001
Cuivre	0,020 - 0,028

Pour le dosage des cendres, ainsi que des différents éléments, nous nous sommes servis des techniques classiques suivantes que nous nous contenterons de résumer rapidement :

Cendres (G. Bertrand, P. Thomas). — Incinération du sang défibriné dans une capsule de platine, au four électrique, à une température ne dépassant pas le rouge sombre jusqu'à disparition complète des substances organiques.

Pour le dosage des différents éléments, nous avons toujours employé la méthode de minéralisation liquide préconisée par Grabar-Blanchetière, dont le principe est le suivant : 1 à 5 centimètres cubes de plasma additionnés d'acide azotique concentré sont chauffés, pendant deux à trois heures, au bain-marie à 100°. Lorsque le volume du liquide est relativement réduit, on continue le chauffage sur un bain d'huile de vaseline à 180°, jusqu'à décoloration complète. Après évaporation, le résidu minéral, repris par l'eau distillée ou par une solution étendue d'acide azotique (selon les nécessités des dosages à faire ultérieurement), servait à la détermination quantitative de l'élément qui nous intéressait.

Dosage du phosphore (Javillier et D. Djelatides). — Principe : précipitation du phosphore comme phospho-molybdate d'ammonium; transformation du molybdène contenu dans le complexe en suboxyde de molybdène; oxydation de ce dernier par le permanganate de K.

Dosage du chlore (Laudat). — Principe : destruction organique, en présence d'un excès de nitrate d'argent, par un mélange de permanganate et d'acide azotique. Titration de l'excès de nitrate d'argent par le sulfocyanure de potassium.

Dosage du soufre (Browinsky). — Principe : précipitation du soufre à l'état de baryum pesé.

Dosage du sodium (technique de Blanchetière, modifiée par Grabar). — Principe : précipitation du sodium sous la forme d'un complexe lourd et insoluble, — sel de Streng, — acétate triple d'uranium, de magnésium et de sodium. Le poids du précipité, divisé par 60,43, donne la quantité de sodium contenue dans l'échantillon analysé.

Dosage du potassium (Kramer-Tisdall). — Principe : précipitation du K comme cobalto-nitrite insoluble, — permanganimétrie.

Dosage du calcium (technique de J. de Ward). — Principe : précipitation du calcium à l'état d'oxalate de calcium, — permanganimétrie.

Dosage du magnésium (technique de Canals). — Principe : précipitation du Mg comme phosphate ammoniaco-magnésien (PO_4 Mg NH_4). Dissolution du précipité dans l'acide chlorhydrique, titration de l'anhydre phosphorique formé par l'azotate d'urane.

Dosage du fer (technique de Maquenne). — Principe : formation du bleu de Prusse, comparaison de la couleur obtenue à une gamme préparée préalablement à l'aide d'une solution étalon d'alun de fer ammoniacal (0,43 gr. dissous dans 100 centimètres cubes d'acide sulfurique à 2 %).

Dosage du cuivre (Schoenheimer et Oshima). — Principe : minéralisation liquide du sérum, précipitation du cuivre à l'état de sulfure de cuivre. Détermination colorimétrique comme combinaison complexe de cuivre-pyridine-rhodan, colorée en vert.

b) Substances organiques.

La richesse du liquide intérieur des crustacés décapodes en subtances azotées a attiré l'attention de nombreux expérimentateurs. Delaunay, Bottazzi, Baglioni, Loeb, Krukenberg. Halliburton, Heim, donnent des chiffres extrêmement différents pour le contenu en protéines coagulables par la chaleur du liquide cavitaire chez les crustacés décapodes.

Des essais de séparation de ces mêmes protéines arrivent aussi le plus souvent à des résultats contradictoires. Ainsi, Halliburton est d'avis qu'après la coagulation spontanée du fibrinogène, il ne restait plus en solution que de l'hémocyanine ; Heim, par contre, dit avoir pu identifier une albumine vraie dans le sang des crustacés décapodes, après l'élimination des globulines par saturation avec du sulfate de magnésie.

Le liquide intérieur de tous les crustacés étudiés par lui (Maïa, Carcinus mænas, Cancer pagurus), est riche en albumines vraies, tandis qu'après la première phase de la coagulation du sang, les globulines semblent faire complètement défaut.

La présence de l'hémocyanine dans le sang de l'Astacus est constatée par Heim; Krukenberg soutient le contraire, tout en reconnaissant que le liquide intérieur est le plus souvent incolore chez l'Astacus. La bibliographie offre des contradictions analogues quant à la présence de l'hémocyanine dans le sang de Palinurus vulgaris, Carcinus mænas, Maïa squinado, etc.

La présence ou l'absence de l'urée, de l'acide urique, sont de même fortement discutées par Rabuteau, Rapillon, Halliburton, Heim, Dohrn et Witting, qui ont cherché à les mettre en évidence dans le liquide intérieur de différents crustacés décapodes.

Le rôle incontestable que les substances protéiques jouent dans les phénomènes d'immunité nous a poussé à accorder un intérêt spécial à leur détermination chez les crustacés décapodes.

Techniques employées. — *Protéines coagulables par la chaleur.* — Addition de chlorure de sodium (lorsque la solution était pauvre en électrolytes), acidification par l'acide acétique pour réaliser un *p*H compris entre 4,7 et 5. Chauffage au bain-marie à 100° pendant une heure. Le précipité, recueilli sur un filtre taré, est lavé à l'eau bidistillée bouillante jusqu'à élimination complète des sels, puis à l'alcool et à l'éther et enfin séché à 105° jusqu'à poids constant.

Pour le dosage des différentes fractions de substances protéiques, nous nous sommes servi comparativement de 4 méthodes :

1° Hofmeister (saturation par le *sulfate d'ammonium* : saturation à 33 %, précipitation des euglobulines; saturation à 50 %, précipitation des pseudo-globulines, et saturation à 100 %, précipitation des albumines vraies).

2° Hammarsten (saturation par le Na Cl à 100 %, précipitation du fibrinogène ; saturation à 100 % par le sulfate de magnésium, précipitation des globulines, et enfin saturation à 100 % par le sulfate d'ammonium, précipitation des albumines vraies).

3° Technique de Piettre et Villa (précipitation à froid des substances protéiques totales par l'acétone anhydre; extraction des albumines vraies par l'eau bidistillée). Cette technique a présenté, dans notre cas, l'avantage de nous permettre d'isoler

l'hémocyanine qui passe en solution dans l'eau distillée en la colorant fortement en bleu. De la sorte, nous avons pu constater qu'elle se trouvait dans le liquide intérieur de tous les crustacés décapodes étudiés, même chez la Maïa qui, il est vrai, ne contient parfois de l'hémocyanine qu'à l'état de traces.

4° Enfin la méthode *réfractométrique de Reiss* (Abderhalden : *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*). Moins exacte que les méthodes gravimétriques, elle présente l'avantage de permettre d'effectuer des dosages sur de très petites quantités de liquide cavitaire.

Pour déterminer les points isoélectriques des protéines isolées par l'une ou l'autre des méthodes précédemment décrites, nous nous sommes servi comparativement de la méthode de la cataphorèse (appareil en U de Michaelis ou appareil de Todd. Pour les détails, voir bibliographie).

Les autres substances organiques du liquide intérieur, chez les crustacés décapodes, ont été déterminées d'après les procédés classiques suivants :

Urée : technique de Fosse (précipitation spécifique de l'urée à l'état de dixanthylurée).

Acide urique : méthode de Bénédict (défécation par l'acide wolframique, le filtrat mis en présence de l'acide arséno-phosphowolframique et du cyanure de sodium donne, en présence de l'acide urique, une coloration bleue que l'on compare à celle obtenue avec une solution étalon).

Azote non protéique : Micro-Kjeldahl (distillation de l'ammoniac obtenu après destruction organique, dans l'appareil de Parnas-Wagner).

Lipides : Laudat (extraction alcoolique à froid et à chaud de la totalité des lipides. Dosage de la cholestérine libre comme complexe digitonine-cholestérine. Après hydrolyse par la potasse alcoolique et acidification, extraction de la cholestérine libérée, ainsi que des acides gras avec de l'éther. Dosage dans l'extrait éthéré de la cholestérine. Dosage dans la solution aqueuse du phosphore libéré à la suite de l'hydrolyse).

Glucose : Hagedorn-Jensen et Fontes-Thivolle.

RÉSULTATS DE NOS RECHERCHES

Astacus fluviatilis.

a) Protides : protéines coagulables par la chaleur. — Le liquide intérieur de l'Astacus est relativemnt riche en *protéines coagulables par la chaleur*. Leur taux varie généralement entre 3 gr. 84 et 4 gr. 78 pour 100 centimètres cubes de sang ; il diminue pendant la période d'hibernation (janvier-février) en s'abaissant à 3,20-3,32 gr. %. Au même moment, l'indice réfractométrique a une valeur minime 1,34197 (38 divisions de l'échelle réfractométrique), et la viscosité qui semble être fortement influencée par le taux des substances protéiques, baisse à 1,20-1,3.

En soumettant du plasma oxalaté à l'action de différents *p*H (mélanges tampons de Clark et Lubs réalisant des valeurs de *p*H allant de 3 à 9,2), nous avons constaté l'apparition de 3 zones de précipitation maxima : une première, la plus marquée, aux environs de *p*H 3,6; une deuxième, un peu moins prononcée, à un *p*H égal à 6,92; et enfin une troisième, la moins nette, située entre ces deux extrêmes, à *p*H 4,30.

Voici un tableau résumant ces résultats :

*p*H.....	3,10	3,49	3,62	4,10	4,28	4,60	4,83	5,10	5,35	6,92
Précipité.....	—	+—	+++	+	++	—	+	—	—	+++

Du plasma oxalaté soumis à la cataphorèse (appareil en U de Michaelis, 100 volts) pendant deux heures, à un *p*H égal à celui du liquide dans l'organisme (*p*H, 7,8), montre un déplacement manifeste, nettement contrôlable macroscopiquement, des protéines vers l'anode. Mais, si on recueille le liquide des deux pôles, on constate les réactions suivantes :

Anode : liquide trouble qui s'éclaircit peu à peu s'il est laissé au repos. On obtient un sédiment formé presque exclusivement de fins cristaux d'oxalate de calcium, le liquide surnageant est opalescent; acidifié et chauffé à 100°, ce même liquide donne un abondant coagulum.

Cathode : liquide parfaitement limpide ; acidifié et chauffé à 100°, il devient opalescent et bientôt l'on voit apparaître des traces à peine perceptibles d'albumine coagulée.

Il résulte de ces essais que la majorité des protéines contenues dans le plasma de l'Astacus possèdent une charge négative à *p*H 7,8. Pourtant, les traces d'albumine qu'on trouve à la cathode, ainsi que l'apparition d'une zone de précipitation aux environs

de la neutralité, permettent de faire la supposition qu'une des protéines du liquide intérieur de l'Astacus a son point isoélectrique assez rapproché de *p*H 7.

Du plasma oxalaté soumis à l'action précipitante des différents sels neutres nous a donné les résultats suivants :

Saturation à 50 % par l'acétate de potassium : apparition, au bout de quelques heures, d'un fin précipité.

Saturation à 50 % par le chlorure de sodium : pas de précipité.

Saturation à 100 % par le chlorure de sodium : précipité légèrement rosé.

Saturation à 28 % par le sulfate d'ammonium : pas de précipité.

Saturation à 33 % par le sulfate d'ammonium : précipité légèrement rosé.

Saturation à 100 % par le sulfate d'ammonium : précipité abondant rose bleuâtre.

Saturation à 50 % par le sulfate d'ammonium : précipité abondant rose bleuâtre.

En séparant par filtration les précipités obtenus, soit par saturation à 100 % par le sulfate de Mg, soit par saturation à 50 % par le sulfate d'ammonium, on obtient un filtrat nettement coloré en bleu qui coagule par chauffage à 100° et qui, saturé à 75° par le sulfate d'ammonium, donne un précipité bleu. Après élimination de ce dernier par filtration, le liquide incolore qu'on obtient ne coagule plus par chauffage à 100 %, de même qu'il ne précipite plus, par saturation à 100 %, avec le sulfate d'ammonium.

Si du plasma oxalaté est soumis à la dialyse pendant quarante-huit heures (vingt-quatre heures eau courante, vingt-quatre heures eau bidistillée), on obtient un précipité incolore de substances protéiques relativement dénaturées (car elles ne se redissolvent qu'incomplètement dans une solution isotonique de chlorure de sodium) et un liquide légèrement bleuâtre.

Enfin, si on ajoute à un volume de sérum ou de plasma oxalaté deux volumes et demi d'acétone, on obtient un abondant précipité coloré en bleu. Après filtration rapide à la trompe, le gâteau de protéines, lavé à l'acétone et à l'éther et remis en suspension dans l'eau distillée, se dissout partiellement. On obtient une solution fortement colorée en bleu et un précipité qui, bien que les opérations aient été faites à froid, reste partiellement insoluble dans la solution isotonique de chlorure de sodium.

Il ressort de la série d'expériences que nous venons de citer

que les substances protéiques coagulables par la chaleur du liquide intérieur de l'Astacus peuvent être séparées en deux ou même trois fractions :

1° Une première fraction, qui précipite à 50 % de saturation par l'acétate de potassium, à 100% de saturation par le chlorure de sodium, ou à 33 % de saturation par le sulfate d'ammonium. Une dialyse de quarante-huit heures la précipite également en lui faisant perdre en partie sa solubilité dans le sérum physiologique neutre.

Cette fraction, purifiée par plusieurs précipitations, dialysée et finalement soumise à la calcination, donne des cendres qui ne manifestent pas la réaction du cuivre.

Si on précipite cette même fraction par les sels neutres, on entraîne en même temps le lipochrome, de sorte que le précipité obtenu est nettement coloré en rose orangé. Il devient rapidement incolore si on le lave avec de l'alcool ou de l'acétone qui entraînent le lipochrome.

2° Une deuxième fraction qui ne précipite totalement de sa solution qu'à 75 % de saturation par le sulfate d'ammonium (1 volume de plasma plus 3 volumes de solution saturée de sulfate d'ammonium).

Agitée en présence de l'air, sa solution, d'incolore devient nettement bleue.

En présence de grandes quantités d'électrolytes, de même qu'une précipitation par l'acétone, la coloration bleue reste stable. *Elle donne la réaction du biuret sans addition préalable de cuivre.*

Purifiée par plusieurs précipitations, dialysée et ensuite calcinée, elle donne *des cendres riches en cuivre.* Bien que relativement hydrophyle après une dialyse prolongée (8 à 10 jours), elle est presque complètement précipitée de sa solution aqueuse.

Ces caractères sont bien ceux du pigment respiratoire, décrit chez les crustacés décapodes, « *l'Hémocyanine* ».

Le pigment du sang d'Helix pomatia, que nous avions étudié antérieurement, comparable en tout à l'hémocyanine des crustacés décapodes, diffère par le fait qu'il est totalement précipité de sa solution à 50 % de saturation par le sulfate d'ammonium.

3° Le plasma de l'Astacus contient enfin des traces d'une troisième fraction qui s'apparente aux pseudo-globulines par le fait qu'elle reste en solution à 33 % de saturation par le sulfate d'ammonium, et qu'elle n'est précipitée de ses solutions qu'à 50 % de saturation par le sulfate d'ammonium.

Cette substance n'existe qu'à l'état de traces dans le plasma. Par contre, elle représente la majeure partie des globulines contenues dans le sérum. Nous l'appellerons dans ce mémoire fibrine-globuline.

Afin de caractériser ces fractions d'albumines par leurs points isoélectriques, nous avons utilisé la méthode suivante : le plasma héparinisé de six Astacus mâles et femelles, est reçu directement dans une solution saturée de sulfate d'ammonium, la saturation finale étant de 50 %. Il se forme immédiatement un abondant précipité jaunâtre qui est séparé par centrifugation de la solution bleue dans laquelle il restait en suspension. Cette portion liquide est saturée à 100 % par le sulfate d'ammonium; on obtient un précipité bleu qui est redissous dans l'eau distillée, reprécipité et enfin redissous et soumis à une dialyse de quarante-huit heures. Débarrassé de la sorte de l'excès d'électrolytes, il représente *la solution d'Hémocyanine (sol. A)*.

Le précipité jaunâtre est lavé à plusieurs reprises avec une solution saturée à 50 % par le sulfate d'ammonium, et finalement repris par de l'eau distillée. On obtient une solution légèrement jaunâtre qui, soumise à une dialyse de quarante-huit heures, se sépare en deux portions : un précipité incolore partiellement rendu insoluble qu'on reprend par la solution isotonique de Na Cl, il représente la *solution B* de nos expériences (fibrinogène ?), et enfin la fraction restée en solution après quarante-huit heures de dialyse, que nous avons appelée sol. C (solution de pseudo-globulines ?)

En soumettant ces trois solutions à l'action des ions H (mélanges tampons *p*H allant de 2,7 à 8,10), ou à un courant électrique dans le tube de cataphorèse en U de Michaelis, voici les observations que nous avons faites :

1° La fraction *A* (Hémocyanine) a une zone isoélectrique allant de *p*H 2,78 à 4,38, avec un optimum de précipitation à *p*H *3,58*.

2° La fraction *B* a une zone isoélectrique très large qui va de *p*H 3,84 à *p*H 7,10, avec un optimum de précipitation à *p*H *5,71*.

3° La fraction *C* (pseudo-globuline ?) a une zone isoélectrique restreinte comprise entre *p*H 3,22 et 4,88, avec un maximum de précipitation à *p*H *4,38*.

Les expériences de cataphorèse nous ont donné des résultats analogues, bien qu'un peu différents; hémocyanine, zone isoélectrique *p*H 3,4-4,6; pseudo-globuline, zone iso-électrique *p*H 4,6-

5,8. La cataphorèse ne nous a pas permis de caractériser le fibrinogène, à cause de l'instabilité de sa solution.

Voici un tableau résumant ces recherches :

				A			*C*				*B*				
*p*H	2,78	3,06	3,22	3,58	3,84	4,10	4,38	4,68	4,98	5,31	5,48	5,71	5,98	6,11	7,10
A..	+−	+−	++	(+++)	+−	+−	+−	−	−	−	−	−	−	−	−
B..	−	−	−	−	+−	+−	+−	+−	+−	+	+	(++)	+−	+−	+−
C..	−	−	+−	+−	+	+	(++)	+−	+−	−	−	−	−	−	−

La richesse du liquide intérieur de l'Astacus en protéines coagulables par la chaleur, ainsi que le taux des différentes fractions précédemment décrites, sont exposés dans le tableau qui suit. Ces chiffres résument les résultats de nombreux dosages faits comparativement sur le plasma citraté, ainsi que sur le sérum (liquide qui s'échappe du caillot lorsque la coagulation n'a pas été empêchée).

	Grammes pour 100 cc.			
	de plasma héparinisé		de sérum	
Albumines totales	4,31		4,36	
Hémocyanine	2,86		3,07	
Pseudoglobuline	0,39	1,45	0,92	1,28
Fibrinogène	1,062		0,36	
Viscosité	1,7		1,45	
Indice réfractométrique...	1,34392		1,343394	
	(43,1 divisions) de l'échelle réfractométrique.		(43,2 divisions)	

Il semble d'après l'examen de ce tableau que lorsque l'on supprime la prise en masse du liquide intérieur de l'Astacus par un anticoagulant, le taux des protéines totales coagulables par la chaleur reste sensiblement le même, bien qu'un peu plus élevé dans le sérum (4,31 gr. % plasma; 4,36 gr. % sérum), mais les rapports entre les différentes fractions varient notablement. La fraction précipitant à 33 % de saturation par le sulfate d'ammonium est trois fois plus abondante dans le plasma (1,062 gr. % de plasma et 0,36 gr. % de sérum); par contre, les fractions précipitant à 50 et 75 % de saturation pour le sulfate d'ammonium se trouvent en quantités plus grandes dans le sérum (0,39 gr. % et 2,86 gr. % de plasma; 0,92 gr. % et 3,07 gr. % de sérum). La viscosité, égale à 1,7 dans le plasma, baisse à 1,45 dans le sérum.

Palinurus vulgaris (Langouste).

Le liquide intérieur de la langouste était, au moment où nous

l'avons examiné (juillet-août), extrêmement riche en substances protéiques coagulables par la chaleur.

En le soumettant comparativement à l'action des sels neutres, du plasma citraté et du sérum, on observe à :

		Plasma citraté	Sérum
28 °/₀ de saturation	par le sulfate d'ammonium	pas de précipitation,	pas de précipitation.
50 —	— l'acétate de potassium.	flocons jaunâtres,	pas de précipitation.
33 —	— le sulfate d'ammonium	précipité jaune rosâtre,	pas de précipitation.
50 —	— — —	précipité jaune rosé,	précipité jaune rose.
100 —	— le sulfate de magnésium	précipité abondant,	précipité abondant.
75 —	— — d'ammonium	précipité abondant bleu,	précipité abondant bleu.

1° Il existe donc, dans le plasma citraté de la langouste, une substance de nature protéique qui est précipitée de sa solution *à 50 % de saturation par l'acétate de K*, ou à *33 % de saturation par le sulfate d'ammonium*. Cette substance est de même précipitée à 100 % de saturation par le Na Cl et par une dialyse de quarante-huit heures; *elle n'existe pas dans le sérum*, C'est le fibrinogène.

Si on sépare, par filtration, le précipité obtenu en saturant le plasma de langouste à 33 % par le sulfate d'ammonium, et si l'on ajoute au filtrat limpide du sulfate d'ammonium jusqu'à saturation à 50 %, le liquide devient légèrement opalescent, *mais il n'y a pas de précipitation*. Par contre, si le sérum est saturé à 33 % par le sulfate d'ammonium, il devient à peine opalescent; il faut pousser la saturation à 50 % pour observer l'apparition d'un précipité.

2° Il semble donc exister dans le plasma de langouste une deuxième fraction protéique qui présente les caractères des pseudo-globulines; on ne la trouve qu'à l'état de traces dans le plasma, tandis qu'elle est nettement dosable dans le sérum. Nous l'appellerons fibrino-globuline.

3° Le plasma, ainsi que le sérum, contiennent chez la langouste, aussi bien que chez l'Astacus, une troisième fraction qui précipite seulement à 75 % de saturation par le sulfate d'ammonium. La solution bleuit au contact de l'air, ses cendres sont riches en cuivre, c'est le pigment respiratoire ou l'hémocyanine.

Le plasma citraté de langouste soumis à l'action de ions H, de

même qu'à la cataphorèse, nous a permis d'identifier les trois fractions par leurs points isoélectriques.

Fibrinogène : zone isoélectrique *p*H 5-*p*H 7, minimum de charge aux environs de *p*H 6 (1).

Pseudoglobuline (fibrine-globuline) : zone isoélectrique *p*H 3,8-*p*H 5,2, minimum de charge *p*H 4,5.

Hémocyanine : zone isoélectrique *p*H 3,4-*p*H 4,2, minimum de charge *p*H *3,9*.

Voici les chiffres entre lesquels varie, chez la langouste, le taux de la totalité des substances protéiques, ainsi que celui de leurs différentes fractions :

	Plasma citraté gr. % cc.	Sérum gr. % cc. de liquide
Substances protéiques totales ...	6,68 - 8,70	5,93 8,165
Hémocyanine	5,55 - 7,89	5,55 7,045
Fibrinogène	0,72 - 0,78	absent
Pseudo-globuline (fibrine-globuline) indosable	0,34	0,38 1,12

L'hémocyanine représente la majeure partie des substances protéiques du plasma et du sérum de langouste; rapportées à 100, elles se comportent de la manière suivante :

	Plasma	Sérum
Hémocyanine	84 - 90 %	92 - 86 %
Fibrinogène	16 - 9	absent
Pseudoglobuline (fibrine-globuline)	0 - 1	8 - 14

En dosant comparativement l'hémocyanine dans du sérum privé des globulines, soit par 100 % de saturation au sulfate de magnésium, soit par 50 % de saturation au sulfate d'ammonium, nous avons trouvé pour elle des valeurs très voisines. Dans le premier cas, 5 gr. 885; dans le deuxième, 5 gr. 900 pour 100 centimètres cubes de sérum. Par la technique de Piettre et Villa, le même échantillon de sérum ne nous a donné que 5 gr. 40 d'hémocyanine pour 100 centimètres cubes.

(1) Le point isoélectrique du fibrinogène est plus difficile à déterminer, à cause de la vitesse avec laquelle cette substance est rendue insoluble par la dialyse ou par les solvants des lipoïdes. Il nous est même arrivé de constater, en saignant une langouste mourante, que de son plasma fluoré précipitait spontanément, au bout de douze heures, une substance protéique qui ne pouvait plus être mise en solution qu'en présence d'un excès d'acide ou de base.

Homarus vulgaris.

Le taux des protéines coagulables par la chaleur contenues dans 100 centimètres cubes de liquide intérieur chez le homard, variait à la même époque entre 3 gr. 4 et 5 gr. 86.

Eupagurus prideauxi.

Le liquide intérieur de l'eupagure est très riche en substances protéiques coagulables par la chaleur; leur taux variait, en juillet-août, entre 6 et 8 grammes pour 100 centimètres cubes de liquide.

Nous avons pu caractériser chez lui, comme chez la langouste, 3 fractions protéiques qui diffèrent entre elles, sauf les caractères déjà cités, par les températures de coagulation.

Fibrinogène	56°
Fibrine-globuline	75° - 69°
Hémocyanine	64° - 65°

Brachyoures.

Le liquide intérieur des brachyoures est en général beaucoup plus pauvre en protéines coagulables par la chaleur que celui des macroures. Le fibrinogène *n'existe qu'à l'état de traces* chez les animaux en dehors de la mue. Son taux augmente avant la chute de la carapace. C'est au même moment que l'on observe, après l'agglutination des éléments figurés, une sorte de gélification du plasma (gel presque fluide), gélification qui, en général, n'existe pas en dehors de la mue.

Maïa squinado.

Le sang de Maïa est relativement pauvre en substances protéiques; il contient très peu d'hémocyanine, parfois même rien que des traces.

	Gr. % cc.
Substances protéiques totales	1,52
Globulines	1,18
Pseudoglobulines	1,16
Fibrinogène	0,02
Hémocyanine	0,10

Portunus depurator.

Le dosage de la totalité des substances protéiques coagulables par la chaleur, ainsi que des différentes fractions contenues dans le liquide intérieur du crabe nageur, nous a donné les résultats suivants :

Albumines totales	3,64 - 4	gr. % cc.	de sang
Hémocyanine	0,96 - 1	—	—
Globulines	2,68 - 2,98	—	—

CANCER PAGURUS.

Le taux des protéines coagulables par la chaleur contenues dans le liquide intérieur du tourteau varie entre 3 et 4 grammes %. Elles peuvent être fractionnées, comme chez le Maïa, en trois fragments présentant les mêmes caractères physico-chimiques et chimiques que ceux isolés du sang de Maïa.

CARCINUS MÆNAS.

Le liquide intérieur des crabes, en dehors de la mue, contient environ 2,10 à 2,20 gr. de protéines coagulables par la chaleur pour 100 centimètres cubes. Ces protéines peuvent être fractionnées en trois portions :

	Gr. % cc.
Albumines totales coagulables à 100° ..	2,20
Hémocyanine	1,19
Globulines	0,81
Pseudoglobulines	0,31
Fibrinogène	0,50

Albumoses, Peptones.

Chez tous les crustacés décapodes que nous avons étudiés, le liquide intérieur ne contenait *ni albumoses, ni peptones*. Après élimination des protéines coagulables par la chaleur, la réaction du biuret, ainsi que toutes les autres réactions des substances protéiques, ont constamment été négatives.

Azote non protéique. Acides aminés. Ammoniac. Urée, acide urique.

Après élimination des protéines coagulables par la chaleur, le liquide intérieur de l'Astacus contenait, en général, 0,006 à 0,008 gr. d'azote non protéique %. Les réactions des *acides aminés*, ainsi que celles de l'ammoniac, ont toujours été négatives.

Le dosage de l'urée par la méthode de Fosse nous a permis de mettre en évidence des quantités allant de 0,0068 à 0,0070 gr. pour 100 centimètres cubes de liquide intérieur.

On trouve aussi de *l'acide urique*, son taux variant entre 0,002 et 0,0024 gr. %.

Lipides.

La présence ou l'absence des lipides chez les crustacés décapodes n'a pas fait l'objet d'une étude spéciale de la part des

différents expérimentateurs. La totalité des lipides contenus dans le liquide intérieur de l'Astacus varie, en général, entre 0,50 et 0,59 gr. pour 100 centimètres cubes.

Les différentes fractions déterminées par la méthode de Laudat se trouvent dans les proportions suivantes :

	Gr. pour 100 cc. de liquide intérieur.				
	Totalité des lipides	Cholest. libre	Lipoïdes phosphorés	Cholest. éthérifiée	Lipochrome
Astacus	0,50 - 0,59	0,049	traces	0,03 gr. %	0,42
Eupagurus prideauxi...	0,52	0,0182	0,0543	0,0037	0,440
Maïa squinado.....	0,11	0,0121	0,0350	—	0,060 gr.

Glucides.

Le liquide intérieur d'Astacus contient *0,16 à 0,20* gr. de sucre réducteur exprimé en glucose pour 1000 centimètres cubes, si le dosage est effectué immédiatement après la saignée de l'animal. Quelques heures plus tard, il semble complètement dépourvu de sucres réducteurs. Cette constatation nous permet de conclure à la présence d'un ferment glycolytique dans le liquide intérieur de l'Astacus.

Ferments.

Heim dit avoir mis en évidence un ferment amylolytique, ainsi qu'un ferment protéolytique dans le sang du crabe, des Homards et des Maïas. Fleig, Abelous et Portier trouvent des oxydases dans le sang des crustacés.

Nos recherches nous ont montré que le liquide intérieur de l'Astacus, bien *débarrassé par centrifugation de ses éléments figurés,* ne contient ni *oxydase,* ni *peroxydase,* ni *catalase.* De même, il ne contient pas de *ferments protéolytiques* (pepsine, trypsine).

Par contre, nous avons pu mettre en évidence un ferment amylotique. Au bout de quarante-huit heures, 5 % de la quantité d'amidon ajoutée à sa solution était transformée en glucose. (Technique : 25 centimètres cubes de solution d'amidon à 0,5 % + 5 centimètres cubes de mélange de phosphates m/3 (*p*H 6,8) + 1 centimètre cube *de plasma*; séjour de quarante-huit heures à 37°. Dosage du glucose par la méthode de Bertrand. Témoin, 25 centimètres cubes sol. d'amidon + 5 centimètres cubes mélange tampon *p*H 6,8 + 1 centimètre cube de salive).

TROISIÈME PARTIE

MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU LIQUIDE INTÉRIEUR CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES, EN TRAIN DE MUER

La mue est une des particularités des crustacés décapodes qui rend l'étude de leur liquide intérieur extrêmement intéressante.

La bibliographie n'offre pourtant que de rares données, un travail d'ensemble sur les modifications de la composition chimique et physico-chimique du liquide intérieur des crustacés au moment de la mue faisant presque complètement défaut.

Nos recherches ont porté surtout sur l'Astacus. Grâce à la facilité de nous le procurer et de le garder pendant de longs mois en captivité au laboratoire, il nous a permis de l'étudier plusieurs années de suite et de faire de nombreuses observations que nous exposons dans ce chapitre spécial, afin de mieux attirer l'attention sur elles.

La mue correspond chez les crustacés à un accroissement de la taille des animaux. Elle a lieu surtout en été, se répétant chez les tout jeunes 6 à 7 fois à partir de fin avril jusqu'à mi-octobre.

Dans la deuxième année de leur vie, les Astacus muent 3 à 4 fois et, enfin, une écrevisse de grande taille mue en général deux fois.

La première mue commence fin avril et finit fin juillet. La deuxième mue commence en septembre pour finir mi-octobre. Une des premières modifications qui a attiré notre attention chez les animaux approchant de la mue était la coloration de leur liquide intérieur. Celui-ci d'incolore devenait nettement rose ou rose orangé. De plus, immédiatement avant et *surtout après* la chute de la carapace, le sang de l'Astacus coagule si vite qu'il bouche la pipette et rend la saignée des animaux extrêmement difficile.

L'indice réfractométrique qui, chez une écrevisse normale, varie entre 34 et 47 divisions de l'échelle réfractométrique (1,34199-1,34575), monte chez l'écrevisse qui approche de la mue, allant parfois jusqu'à 68 divisions de l'échelle réfractométrique (1,35316). Cette modification de l'indice réfractométrique est si constante qu'elle nous permettait, à la fin, d'isoler avec certitude les Astacus devant muer quelques heures après nos déterminations.

Ainsi, parmi 50 Astacus qu'on nous avait procurés le 29 mai 1928, nous avons eu la surprise de constater qu'il n'y avait que cinq mâles, le reste étant des femelles.

En examinant l'indice réfractométrique du sang des 5 mâles et des 12 femelles, nous avons trouvé les valeurs suivantes :

Mâles :					
Indice	1,3 5031	1,3 5013	1,3 5260	1,3 5316	1,3 5163
Div. réfract...	60,2	59,8	66,5	68	64

Femelles :													
Indice	1,3 4426	4639	4654	4361	4440	5307	4772	4954	4575	4336	4623	4500
Div. réfract...	44	49,7	50,1	42,3	57,8	67,8	53,3	58,2	48	41,6	49,3	46

Toutes les femelles étaient porteuses d'œufs; une seule qui s'en était débarrassée, avait un plasma dont l'indice était égal à 1,35307 (67,8 div. réfract.).

Les cinq mâles, ainsi que la femelle, furent isolés du reste des écrevisses et tenus en observation. Tous ont perdu leur carapace dans les vingt-quatre heures suivantes. Cette observation explique pourquoi, sur les 50 Astacus procurés à la fin de mai, 45 étaient des femelles. Les mâles en train de muer restaient probablement cachés dans les retraites, afin que, pendant la calcification de leur nouvelle carapace, ils soient à l'abri de la voracité de leurs congénères.

En saignant les animaux qui avaient mué au bout de sept jours, lorsque la nouvelle carapace semblait complètement calcifiée, nous avons constaté que le liquide intérieur était redevenu incolore et à peine opalescent à la sortie du corps. La coagulabilité était redevenue normale et l'indice réfractométrique avait des valeurs comprises entre 38 et 50 divisions de l'échelle réfractométrique (38, 42, 43,3, 44, 40,5).

Un mois après ces premières déterminations, la majorité des femelles avaient perdu leurs œufs. En examinant le liquide intérieur de 10 d'entre elles, nous avons constaté qu'il commençait à se colorer et que l'indice avait atteint les valeurs suivantes :

	(1)	*	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Indice.....	1,3	*5106	4780	4768	4984	5106	4873	4746	4910	5143	5021
Div. réfrac.		*62,3*	53,5	53,2	59	*62,3*	56	52,6	57	*63,3*	*60*

Les animaux 9 et 10 faisaient partie du lot dont le liquide intérieur avait eu, un mois à l'avance, un indice compris entre 40 et 50 divisions du réfractomètre.

Les Astacus 1, 5, 9 et 10 ont été séparés et tenus en observation; l'un d'eux ayant perdu sa carapace au bout de vingt-quatre heures, les trois autres ont été saignés et leur sang rendu incoagulable par le citrate de soude; l'analyse nous a montré que la composition du plasma citraté était la suivante :

Eau	92,8 gr. pour 100 cc.
Résidu sec	7,28 — —
Résidu volatil	6,18 — —
Cendres	1,02
Subst. prot. totales.....	6,505
Fibrinogène (Euglobulines)...	4,15 gr. pour 100 cc.
Pseudoglobulines	0,570
Hémocyanine	1,76
Calcium	55,8 mgr. pour 1000 cc.
*p*H	8

En déterminant l'indice réfractométrique qui se traduit, suivant cette première expérience, par une augmentation considérable du taux des protéines coagulables par la chaleur, de même qu'en notant l'apparition et la disparition des gastrolithes (réserves calcaires connues populairement sous le nom d'yeux d'écrevisse), nous avons groupé dans les recherches ultérieures les animaux plus ou moins éloignés de la mue d'après le schéma suivant :

1° *Astacus normal.* — Astacus éloigné de la mue qui n'a pas encore de réserve calcaire et dont le liquide intérieur est incolore. Indice égal à 1,34392. (38-43 div. de l'échelle réfractométrique).

2° *Astacus se préparant pour la mue.* — Liquide intérieur coloré en rose. Indice au-dessus de 1,34654 (50 divisions de l'échelle réfractométrique), début de formation calcaire.

3° *Astacus au voisinage immédiat de la mue.* — Liquide intérieur fortement coloré en rose. Indice réfracto-

* A cause de l'espace restreint, nous n'avons pas pu mettre en face de chaque numéro, le *1,3*.

métrique au-dessus de 1,35021 (60 divisions de l'échelle réfractométrique), formations calcaires de grande taille.

4° *Astacus immédiatement après la chute de la carapace* (carapace molle). — Formation calcaire intacte, sang extrêmement coagulable. Indice variant selon les conditions plus ou moins favorables dans lesquelles s'est fait la chute de la carapace entre 50 et 40 divisions de l'échelle réfractométrique.

5° *Astacus partiellement consolidé* (carapace légèrement calcifiée). — Réserve calcaire réduite à moitié.

6° *Astacus complètement consolidé* (carapace nettement calcifiée bien que très fragile). — Réserve calcaire complètement disparue.

Nous avons pu de la sorte suivre les variations des différentes substances dissoutes dans le plasma, et voir lesquelles parmi elles semblaient jouer un rôle plus important dans le phénomène de la mue.

Voici les résultats de nos recherches :

I. Variations des constantes physico-chimiques.

Parmi les caractères physico-chimiques du liquide intérieur chez l'Astacus, c'est surtout *l'indice réfractométrique* qui présente les variations les plus importantes. Le *p*H, sensiblement constant dans le reste du temps, augmente pendant la calcification de la nouvelle carapace, atteignant parfois des valeurs allant jusqu'à 8,3. La viscosité semble être influencée par la coagulabilité du sang; nous avons trouvé les plus grandes valeurs immédiatement après la chute de la carapace, lorsque le sang coagulait presqu'instantanément. Le delta augmente légèrement dans la période qui précède immédiatement la chute de la carapace.

Voici un tableau résumant ces variations :

	Division de l'échelle réfracto-métrique	Indice réfractomé-trique	*p*H	Δ	Viscosité (Hess)
Astacus avant la chute de la carapace :					
1. Sans réserves calcaires	42	1,34360	7,77 - 7,83	0,59	1,35
2. Début de formations calcaires	50	1,34654	—	—	—

3. Formations calcaires de grande taille.	68	1,35021	7,77 - 7,83	0,70	1,45
Astacus après la chute de la carapace :					
4. Carapace molle (réserve calcaire intacte)	48	1,34575	8,2 - 8,3	—	1,70
5. Carapace mi-consolidée (réserve calcaire à moitié disparue)	43	1,34392	—	—	—
6. Carapace consolidée (réserve calcaire disparue).....	38	1,34199	7,8 - 7,9	0,60	1,25

II. Variations des substances minérales.

	Grammes pour 100 cc. de plasma						
	Cendres	Calcium	Magnésium	Sod.	Potas.	Chlore	Phosph.
Astacus normal ..	1,5 -1,6	0,036-0,043	0,0150	0,17	0,003	0,5-0,6	0,017
Astacus avant la mue.....	0.97-1,48	0,052-0,060	0,0128	0.14	0,00213	0,6	0,010-0,021
Carapace molle...	0,60-0,97	0,047-0,050	0,015-0,018	0,13	traces	0,4-0,5	0,010-0,015
Carapace consolidée.....	0,79-1,07	0,036-0,042	0,014-0,017	0,17	0,003	0,6-0,7	0,011-0,012

Le fer existe à l'état de traces; nous n'avons pas pu mettre en évidence le manganèse.

Les chiffres réunis dans ce tableau nous montrent que, *sauf le calcium,* le taux des cendres, ainsi que celui des autres éléments anorganiques, ne varie pas, ou fait assez surprenant, baisse légèrement dans le plasma de l'Astacus pendant toute la période de la mue.

Le calcium augmente aussi bien pendant la formation des gastrolithes que pendant la calcification de la nouvelle carapace. Pourtant, cette augmentation reste beaucoup au-dessous de celle signalée par certains auteurs chez les Maïas, en train de muer.

On ne peut expliquer cette différence que par le fait que les Maïas ne fabriquent pas de réserves calcaires. Elles prennent les sels de chaux nécessaires à la consolidation dans le milieu ambiant, le sang étant de la sorte le réservoir naturel des sels de calcium.

Il serait intéressant de voir si ces différences se maintiennent pour tout le groupe des Macroures vis-à-vis du groupe des Brachyoures.

III. Variations des substances organiques.

Le taux des substances organiques chez l'écrevisse, *au voisinage de la mue, atteint des valeurs qui sont 2 à 3 fois plus grandes* que chez l'écrevisse normale. Cette élévation s'observe en même temps que le début de la formation des réserves calcaires. Elle atteint un maximum dans les dernières heures qui précèdent la chute de la vieille carapace. De nombreuses analyses nous ont permis de voir que, parmi les substances organiques, ce sont surtout *les protéines coagulables par la chaleur* qui, par l'augmentation considérable de leur taux, déterminent et l'élévation de l'indice réfractométrique signalée dans le chapitre précédent et l'élévation du poids des substances organiques.

L'augmentation du taux des protéines revient presque exclusivement à la fraction qui précipite à 33 % de saturation par le sulfate d'ammonium *(fibrinogène)*, lorsqu'il s'agit du plasma, et à celle qui précipite à 50 % de saturation par le sulfate d'ammonium, lorsqu'il s'agit du sérum.

L'azote non protéique est légèrement augmenté immédiatement avant la chute de la carapace : 0,016 gr. %, au lieu de 0,012 gr. %, comme chez l'écrevisse en dehors de la mue.

Nous avons trouvé, pour le taux de l'urée et de l'acide urique, des chiffres légèrement au-dessus des valeurs normales.

Variations des substances azotées chez l'Astacus en train de muer :

Avant la mue :	Valeurs moyennes exprimées en grammes pour 100 centimètres cubes de plasma						
	Protéine tot. coag. à 100°	Fibrinogène 33 % sat. par le sulfate d'ammonium	Pseudo-globulines 50 % sat. par le $SO_4(NH_4)_2$	Hémocyanine	N. non protéique	Urée	Acide urique
Astacus normal..	4,52	1,34	0,28	2,90	0,102	0,068	0,022
Début de réserve calcaire	6,50	4,157	0,57	1,76	—	—	—
Immédiatement av. la chute de la carapace.....	8,40	5,34	0,56	2.50	0,16	0,079	0,031
Après la mue :							
Carapace molle. Réserve calcaire intacte	6,05	4,29	0,50	1,26	—	—	—
Carapace mi-consolidée. Réserve calcaire réduite.	4,088	2,71	0,55	0,82	—	—	—
Carapace consolidée et pas de réserve calcaire...	4,24	1,34	0,62	2,28	0,12	0,870	0,023

IV. Variations des lipides.

Le liquide intérieur de l'Astacus en dehors de la mue contient environ 0,50 gr. % de lipides. Aux approches de la mue, le taux des lipides augmente en devenant deux fois plus grand (1,002 %).

Des essais de dosages comparatifs, faits par la méthode de Laudat, nous ont permis de fractionner l'extrait alcoolique comme l'indique le tableau suivant :

Variations des lipides dans le liquide de l'Astacus en train de muer :

	Extrait éthéré total	Cholest. libre, gr. pour 100 cc.	Lécithides	Cholest. éthérifiée	Acides gras	Non déterminé, lipochrome?
Astacus normal.	0,53	0,049	absentes	0,0032	0,023	0,465
Astacus avant la mue (petite réserve calcaire).	0,486	0,110	absentes	0,0026	0.0346	0,372
Astacus avant la mue (grande réserve calcaire).	0,984	0,16	absentes	0,0240	0,090	0,71
Astacus après la mue (carapace molle)	0,285	0,104	absentes	0,0170	0,043	0,121
Astacus mi-consolidé	0,264	0,120	absentes	0,006	0,056	0,082
Astacus consolidé	0,50	0,048	absentes	0,003	0,022	0,427

Il y a donc, chez l'Astacus, dans la période qui précède la chute de la carapace, une augmentation assez importante du taux des lipides dissous dans le liquide intérieur. Cette augmentation semble assez également répartie entre les différentes fractions qui composent l'extrait éthéré. Il est intéressant à noter que le liquide intérieur de l'Astacus ne contient pas de lipoïdes phosphorés.

La majeure partie des substances solubles dans les solvants des lipoïdes est représentée chez l'Astacus par le lipochrome, dont le taux s'élève immédiatement avant la chute de la carapace en devenant deux fois plus grand que chez l'Astacus en dehors de la mue.

Contrairement aux affirmations de Vitzou, nous n'avons pas pu déceler de *glycogène* dans le sang des écrevisses, il n'existe pas plus en temps normal qu'au moment de la mue.

Quant au *glucose*, son taux baisse légèrement aux approches de la mue (*0,16 %* écrevisse normale, *0,019* écrevisse immédiatement avant la mue).

V. Variations des ferments.

Après l'élimination des éléments figurés, le plasma de l'Astacus en train de muer semble être dépourvu aussi bien des ferments protéolytiques que de catalase et de peroxydase.

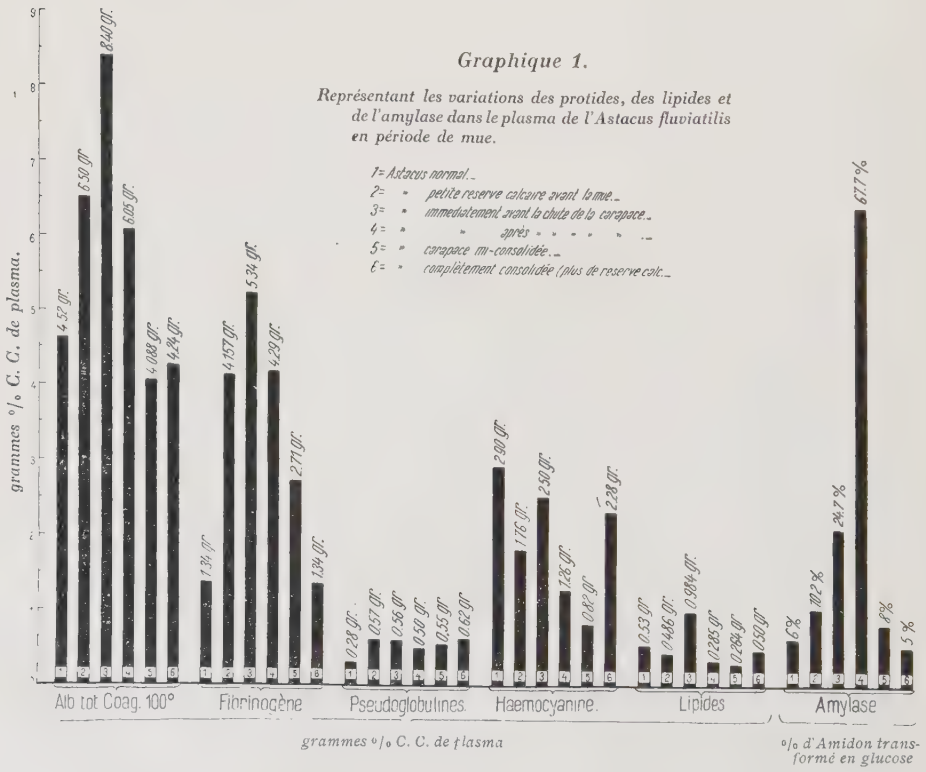
Par contre, le pouvoir amylolytique que nous avions déjà signalé chez l'écrevisse, en dehors de la mue, augmente chez l'Astacus qui vient de perdre sa carapace pour atteindre des valeur 13 à 14 fois plus grandes que les normales.

Pouvoir amylolytique exprimé en % d'amidon transformé en glucose, au bout de 48 heures, par 1 centimètre cube de plasma citraté :

1.	Astacus normal	6 %
2.	Astacus avant la mue (petite réserve calcaire)	10,2
3.	Astacus avant la mue (grande réserve calcaire)	24,7
4.	Astacus après la mue (carapace molle)	67,7
5.	Astacus mi-consolidé	8
6.	Astacus consolidé	5

Graphique 1.

Représentant les variations des protides, des lipides et de l'amylase dans le plasma de l'Astacus fluviatilis en période de mue.



VI. Variations provoquées par la mue chez d'autres crustacés décapodes

Le peu de temps dont nous disposions à la Station Biologique de Roscoff ne nous a malheureusement pas permis de voir si les crustacés décapodes marins subissaient, au moment de la mue, des modifications aussi importantes dans la composition de leur liquide intérieur, que l'Astacus.

Pourtant des exemplaires isolés de Maïas en train de muer, ainsi que certaines observations faites chez *Cancer pagurus* ou *Carcinus mænas*, nous permettent de croire que tous les crustacés décapodes présentent, au moment de la mue, des variations considérables dans la composition du liquide intérieur.

MAÏA SQUINADO.

Le liquide intérieur des Maïas est en général plus pauvre en substances protéiques coagulables par la chaleur que celui de l'Astacus.

Il contient en moyenne *1,52 gr. %* de protéines coagulables par la chaleur, représentées en majorité par une globuline qui précipite à 50 % de saturation par le sulfate d'ammonium, l'hémocyanine et le fibrinogène n'existant qu'en très petites quantités (fibrinogène, 0,02 %, et hémocyanine, 0,10 %).

Pourtant au mois d'août, dans la période de mue, nous avons trouvé des exemplaires dont le sang était beaucoup plus riche en protéines coagulables par la chaleur (*3,55 gr. %* centimètres cubes). L'augmentation portait surtout sur la fraction pseudo-globuline (3,02 gr. %). Il y avait pourtant une élévation évidente du taux du fibrinogène (0,44 %), ainsi que de l'hémocyanine (0,40 %).

Le liquide intérieur des mêmes animaux avait un pouvoir coagulant beaucoup plus marqué, comme nous l'avons déjà signalé dans le chapitre de la coagulation.

Des Maïas ayant mué, dont la carapace était incomplètement calcifiée, avaient par contre un sang pauvre en substances protéiques coagulables par la chaleur. *Protéines totales*, 0,30-1,10 gr. pour 100 centimètres cubes; *pseudo-globulines*, 0,30-0,92 gr. %; fibrinogène absent; hémocyanine trace à 0,18 gr. %.

Les albumoses et les peptones sont absentes du sang des Maïas. Par la méthode de Fosse, nous avons trouvé des traces d'urée, 0,0365 gr. pour 1000 centimètres cubes de sang.

Cancer pagurus.

Le sang du tourteau contient en moyenne 3 à 4 grammes de protéines coagulables par la chaleur dans 100 centimètres cubes.

Il nous est arrivé pourtant de trouver, dans la période de mue chez un animal mâle de grande taille (diam., 25 × 15), un liquide intérieur intensément coloré en rose qui bleuissait au contact de l'air. Il contenait 8 grammes de protéines coagulables par la chaleur pour 100 centimètres cubes.

A la même époque, une femelle presqu'aussi grande (diam., 15 × 10), saignée le même jour, avait un liquide intérieur qui ne contenait que 0,34 gr. de protéines coagulables par la chaleur pour 100 centimètres cubes.

Les observations faites chez l'Astacus nous permettent de supposer que ces différences sont probablement dues au fait que le mâle était examiné avant la chute de sa carapace, et la femelle après la consolidation de la nouvelle carapace.

Carcinus Mænas.

Le plasma des crabes qui approchent de la mue est coloré, comme chez l'Astacus, en rose ou rose orangé; il présente la deuxième phase de la coagulation plus accentuée que chez les normaux; on observe, chez les Maïas, une gélification de toute la masse sanguine avec la formation d'un caillot semi-fluide. A cette même époque, l'enrichissement en protéines coagulables par la chaleur est évident.

Voici un tableau qui résume comparativement les chiffres représentant le taux des substances protéiques chez le crabe en dehors et au voisinage de la mue.

	Crabes éloignés de la mue	Crabes au voisinage de la mue
	Chiffres moyens, grammes pour 100 cc.	
Albumines totales coagulables à 100°	2,20	5,3
Hémocyanine	0,72	2,17
Globulines	0,67	2,83
Pseudoglobulines	0,31	2,13
Fibrinogène	0,50	0,70
Viscosité	1,35	1,35

Absence chez Carcinus mænas, comme chez l'Astacus, d'albumoses et de peptones.

QUATRIÈME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PHÉNOMÈNE DE LA CALCIFICATION

Essais d'interprétation du mécanisme de la calcification.

La calcification, c'est-à-dire l'imprégnation de certains tissus par les sels insolubles de chaux, est un processus qui a attiré l'attention de nombreux expérimentateurs et donné lieu à de multiples recherches. L'intérêt de cette question a augmenté par le fait qu'en dehors de la calcification physiologique existait aussi une calcification pathologique.

Comment expliquer en effet l'apparition de dépôts calcaires dans des organes qui n'en contiennent pas habituellement; comment expliquer surtout l'incapacité de se consolider des tissus qui, à l'état normal, fixent et précipitent facilement les sels de chaux ?

L'analyse a montré que le résidu minéral des os est formé, chez les mammifères, presqu'exclusivement par du phosphate et du carbonate de calcium et de magnésium. Ces sels se trouvent dans l'os d'après Wells, Meyer et Wells, dans les proportions suivantes :

$Ca_3 (PO_4)_2$..... 86
$Ca\ CO_3$..... 12
$Mg_3 (PO_4)_2$..... .. 1

Les ions Ca, PO_4 et CO_3 existeraient dans l'os, selon Werner et Grossmann, sous la forme d'un complexe du type de l'hydroxyapatite :

$$(Ca_3\ P_2\ O_8)_3 \quad Ca\ (OH)_2.$$

La calcification pathologique est, d'après Wells, quant au résidu minéral, identique à la calcification physiologique.

R. Klement a montré enfin que la composition du résidu minéral de *l'os jeune* est relativement différente de celle de l'os vieux.

Os jeune		Os vieux	
$Ca_3 (PO_4)_3$.....	52,7	$Ca_3 (PO_4)_2$	86
$Ca (OH)_2$	5,20	$Ca CO_3$..... ..	12
$Ca CO_3$.....	2,30	$Mg_2 (PO_4)_2$.....	1

Si les auteurs sont à peu près du même avis lorsqu'il s'agit de la composition du résidu minéral des os, les opinions diffèrent beaucoup dans l'interprétation des causes qui provoquent la concentration et surtout la précipitation des sels de chaux dans le tissu ostéoïde.

Hofmeister est d'avis que la calcification est due à une modification du *p*H. Dans un milieu riche en CO_2 le tissu se charge de sels de chaux; à la suite d'une perte de CO_2 se traduisant *par une alcalinisation du milieu,* les sels de chaux devenus insolubles précipitent de leur solution.

Rapkine et Prenant, dans un travail relativement récent, semblent confirmer cette hypothèse, car, en étudiant les variations du *p*H dans le liquide blastocœlien de Paracentrotus lividus Lamarck, au cours du développement des larves, ils constatent que, « dans la blustula et jusqu'à la formation du mésenchyme primaire, le *p*H reste constant (7 à 7,3). A partir de la formation du mésenchyme, au début de la gastrulation, il s'élève brusquement (en 6 heures environ) jusqu'à *p*H 8 ; puis, plus lentement (en une dizaine d'heures), jusqu'à *p*H 8,5. C'est au moment où il a atteint 8 qu'apparaissent les premières spicules calcaires. Une fois monté à 8,5, le *p*H reste constant pendant cinq heures environ, puis redescend, en vingt-quatre heures à peu près, à sa valeur initiale ».

Pour ces auteurs, il est clair que la montée et la descente de la courbe du *p*H sont en rapport avec le dépôt calcaire. Ils expliquent ce phénomène par l'apparition des cellules du mésenchyme qui, en absorbant le gaz carbonique, provoquent l'élévation du *p*H, l'équilibre se rétablissant par la précipitation du calcium, qui se trouve en solution dans le liquide blastocœlien.

Pfaundler croit que le tissu ostéoïde a une grande affinité pour les sels de chaux, avec lesquels il forme une combinaison soluble. Lorsqu'intervient une cause quelconque capable de rompre l'équilibre, la combinaison se défait et les sels de chaux se précipitent.

La théorie de Klotz, suivant laquelle la calcification serait due à la formation de savons de chaux insolubles, a été contestée par Baldauf et Wells.

En introduisant des fragments de différents tissus préalable-

ment stérilisés dans la cavité péritonéale des cobayes, Wells observe que les fragments se chargent de sels de chaux solubles. C'est le cartilage qui semble avoir la plus grande affinité pour les sels de calcium, de strontium et de baryum; cette affinité est beaucoup plus accentuée chez les cartilages se consolidant physiologiquement que chez le cartilage trachéal, par exemple.

Cette observation a conduit Wells à admettre que la calcification était due *en premier* aux propriétés physico-chimiques spéciales du cartilage qui font qu'il est capable d'absorber, de fixer et de concentrer les sels solubles de chaux.

Tous les tissus qui, par la suite d'une modification quelconque de l'équilibre colloïdal de leur protoplasma, ont subi un début de coagulation (c'est-à-dire une espèce de mort locale), sont susceptibles de s'enrichir tout comme le cartilage en sels de chaux solubles.

Lichwitz explique l'enrichissement du tissu ostéoïde en sels de chaux de la manière suivante : le tissu ostéoïde, avide de sels de chaux solubles, les absorbe par osmose des liquides environnants en formant des solutions saturées en sels de chaux. A la suite d'une cause quelconque, les sels de chaux précipitent brusquement de ces solutions saturées. Le tissu ostéoïde redevient apte à fixer de nouvelles quantités de sels solubles de chaux. Nouvelle précipitation, nouvelle absorption, et ainsi de suite jusqu'à saturation complète du tissu ostéoïde par les sels de chaux.

Pauli et Samec ont pu démontrer que les substances protéiques augmentent la solubilité du phosphate et du carbonate de calcium. L'affinité du cartilage pour les sels solubles de chaux serait due à sa richesse en protéines.

Freudenberg et Gyorgy s'expliquent le processus de la calcification par la formation d'une combinaison entre les substances protéiques et les sels solubles de chaux. Cette combinaison fixe facilement le phosphore et l'acide carbonique. Il se produit de la sorte du phosphate ou du carbonate d'albumine et de calcium, complexe excessivement instable qui se décompose en carbonate ou phosphate insoluble de chaux, et en protéines. Ces derniers fixent de nouveau les sels solubles de calcium et respectivement du CO_2 ou du phosphore. Suivant ce mécanisme devraient se calcifier tous les tissus, s'il n'existait pas des substances qui empêchent le calcium de se combiner avec les protéines. Freudenberg et Gyorgy croient qu'en général les produits du métabolisme cellulaire ne favorisent pas la calcification, de la sorte que tout tissu

vivant dont le métabolisme est normal, ne peut pas fixer et précipiter les sels de chaux.

Cette théorie a été vivement combattue; Klinke admet qu'il ne s'agit pas d'une combinaison entre les sels de calcium et les protéines, mais plutôt d'une absorption à la surface des molécules protéiques de sels de calcium non dissociés.

Dans une série de travaux extrêmement intéressants, Robison a pu montrer qu'il existait dans le cartilage un ferment capable de libérer le phosphore de ses combinaisons organiques (éthers phosphoriques). Ce ferment, qu'il appelle *phosphatase,* présente un maximum d'activité à *p*H 8,5. Hummel ayant trouvé que le *p*H du tissu ostéoïde varie entre 7,5 et 8,5, il est probable que le phosphore mis en liberté par la phosphatase précipite le calcium de ses solutions au sein du tissu devant se calcifier.

Schwartz, Eden et Hermann ont constaté d'ailleurs que le cal osseux est plus riche en phosphore que le cartilage :

$$\frac{Ca}{P} = \frac{1}{0,4} \text{ cartilage ; } \frac{Ca}{P} = \frac{1}{0,6} \text{ os.}$$

De toutes ces théories et hypothèses, un fait semble se dégager incontestablement ; c'est que, dans le processus de la calcification, un des facteurs les plus importants est la propriété que possède le cartilage ou le tissu ostéoïde d'absorber un excès de sels de chaux solubles.

Quant à la précipitation des sels de chaux, le problème n'est pas encore résolu. S'agit-il d'une simple modification de *p*H ? Doit-on admettre sans contestation la théorie de la phosphatase de Robison ? ou bien l'organisme est-il capable d'élaborer à un moment donné un ferment qui provoque la précipitation des sels de chaux ?

Imbert et Guyot, en utilisant dans le traitement des consolidations retardées, le premier du sérum sanguin de blessés présentant des fractures en évolution et non consolidées, le deuxième du sérum sanguin de convalescents de fractures osseuses, obtiennent des guérisons surprenantes par leur rapidité dans des cas où une ou plusieurs interventions chirurgicales étaient restées inefficaces.

Pour expliquer ces résultats, Imbert suppose que le sang d'un fracturé en voie de consolidation doit renfermer à certaines périodes une diastase semblable aux diastases cellulaires qui serait produite par le foyer de fracture lui-même et versée par lui dans la circulation. Cette diastase existerait d'après l'auteur

dans les glandes endocrines qui sécréteraient à leur tour une substance capable de stimuler la consolidation du tissu ostéoïde. Le sang serait donc, chez un individu en train de guérir une fracture osseuse, porteur, à tour de rôle, d'une diastase et d'une substance ostéoformative.

Une expérience personnelle ayant permis au professeur J. Cantacuzène de vérifier l'efficacité du traitement des fractures à consolidation retardée par le sérum des malades et convalescents de fractures osseuses, il nous a vivement engagé à étudier le processus de la calcification chez l'Astacus en premier, chez les animaux et malades atteints de fractures, ensuite.

Comme nous l'avons déjà dit dans l'un des chapitres précédents, une écrevisse de grande taille mue en général deux fois chaque année.

Après l'abandon de l'ancienne carapace, la nouvelle qui est tout à fait molle, se consolide avec une rapidité étonnante; au bout de vingt-quatre à trente-six heures, le processus de calcification est complètement terminé. La rapidité du phénomène, ainsi que la possibilité de nous procurer et de conserver des écrevisses en grand nombre dans les bacs à eau courante du laboratoire, nous offraient des conditions excellentes pour le début de nos recherches.

En sacrifiant des Astacus à différents moments, avant et après la chute de leur carapace, nous avons pu constater les faits suivants :

En dehors de la période de mue, les écrevisses ne possèdent jamais de réserves calcaires; dix à douze jours avant la perte de leur ancienne carapace, on voit apparaître au-dessus de la cuticule, dans le sac cardiaque, de tout petits disques blancs et durs formés d'anneaux concentriques.

Le début de la formation des gastrolithes coïncide avec une coloration du plasma, une élévation de l'indice réfractométrique et une augmentation du taux des protéines coagulables par la chaleur. Lorsque le taux de ces dernières arrive à un maximum (8 à 9 grammes pour 100 centimètres cubes de sang) et que la réserve calcaire a atteint 7 à 8 millimètres de diamètre, l'animal se prépare à sortir de sa carapace. Il s'isole de ses congénères, ne mange plus, reste immobile et l'on voit bientôt apparaître des fentes le long de la carapace des deuxièmes articulations des pattes, ainsi qu'entre le thorax et l'abdomen.

Sous l'apparence d'une immobilité complète, interrompue seulement de temps en temps par de légers soubresauts, l'animal

dégage doucement ses pattes et son céphalo-thorax. L'ancienne carapace semble se décolorer; en réalité, elle se décolle et, si on la soulève avec soin, on constate qu'une couche d'aspect gélatineux s'est interposée entre l'ancienne et la nouvelle carapace. Ce processus dure deux à trois heures, puis brusquement, à la suite de plusieurs secousses énergiques, l'animal dégage d'abord ses grosses pinces et en dernier son abdomen. Il quitte l'ancienne carapace comme s'il quittait un gant et, une fois libre, il se meut extrêmement vite et ne diffère des écrevisses qui n'ont pas mué que parce qu'il est mou et plus intensément coloré. La couche gélatineuse qui l'enveloppait est restée à l'intérieur de l'ancienne carapace. Comme au début elle est encore semi-fluide, on peut la recueillir facilement dans un vase quelconque. Après agitation, on constate que ce gel se sépare en deux fractions :

1° Un liquide incolore qui ne donne après évaporation qu'un résidu négligeable, et 2° une masse translucide qui se contracte et surnage à la surface du liquide.

Cette masse n'est soluble que dans les solutions concentrées d'acides et de bases et ne réduit pas la liqueur cuprique après hydrolyse. Si on laisse ce même gel à l'intérieur de l'ancienne carapace, au bout d'un temps assez court, le liquide disparaît en ne laissant subsister qu'une mince pellicule translucide. Ces caractères nous font croire que, par un mécanisme quelconque, une partie du fibrinogène, accumulée dans le plasma de l'écrevisse avant la mue, passe à travers la nouvelle enveloppe chitineuse afin que, par sa gélification, il facilite le décollement de l'ancienne carapace.

L'écrevisse qui vient de muer est complètement molle. Si on la sacrifie à ce moment, on trouve les réserves calcaires intactes à l'intérieur de son estomac. Le taux des protéines a baissé considérablement; pourtant, le sang est encore fortement coagulable.

Quelques heures plus tard, lorsque la carapace commence à durcir, les gastrolithes ont beaucoup diminué, et enfin lorsque le processus de la calcification est terminé, il n'existe plus trace de réserve calcaire dans l'estomac. En sacrifiant des écrevisses à différents moments de leur consolidation, nous avons pu trouver des gastrolithes de toutes les dimensions (5, 4 et 2 millimètres de diamètre).

Quelle est maintenant la composition de ces gastrolithes ?

En les immergeant dans une solution d'acide acétique (Dubosq-Brazil), nous avons pu éloigner complètement les sels de chaux après un séjour de quarante-huit à soixante-douze heures.

Il reste alors une masse relativement dure, d'aspect corneux, qui retient mal les colorants habituels. Elle est formée de fins anneaux concentriques, d'aspect amorphe. Seule la couche la plus éloignée du centre garde les traces d'une organisation cellulaire, car elle contient de place en place de nombreuses cellules qui se colorent fortement par le bleu de méthylène.

L'analyse chimique des gastrolithes nous a permis de constater que leur composition était la suivante :

Eau	12,9 %	gr. de	réserve calcaire
Substances organiques ...	9,5	—	—
Cendres	77,6	—	—
Calcium	31,6	—	—
Phosphore	0,65	—	—
Magnésium	0,43	—	—
CO_2 (provenant du $CaCO_3$).	33,8	—	—

Le résidu minéral est formé presque en totalité par du carbonate de calcium; pour *100 grammes de cendres,* on a :

96,5 %	$CaCO_3$
1,5 %	$Ca_3(PO_4)_2$
2 %	$Mg_3(PO_4)_2$

$$\frac{Ca\ CO_3}{Ca_3(PO_4)_2} = \frac{96,5}{1,5} = 4,63.$$

$$\frac{Ca_3(PO_4)_2}{Ca\ CO_3} = \frac{1,5}{96,5} = 0,015.$$

L'analyse de la carapace (débarrassée, par décollement, de l'épiderme et du derme sous-jacent), nous a montré qu'elle était composée de :

Eau	42,2 %	gr. de	carapace
Substances organiques.....	27,8	—	—
Cendres	30	—	—
Calcium	20,4	—	—
Phosphore	0,80	—	—
Magnésium	0,34	—	—
CO_2 (provenant du $CaCO_3$).....	10,5	—	—

Le résidu minéral de la carapace est lui aussi formé en majorité par du carbonate de calcium; pourtant, les quantités correspondantes de phosphate, de calcium et de magnésium, pour *100 grammes de cendres,* sont nettement plus élevées, comme il ressort du tableau suivant :

77,6 %	$CaCO_3$
18,4 %	$Ca_3(PO_4)_2$
4 %	$Mg_3(PO_4)_2$

$$\frac{Ca\ CO_3}{Ca_3\ (PO_4)_2} = \frac{77,6}{18,4} = 4,3.$$

$$\frac{Ca_3\ (PO_4)_2}{Ca\ CO_3} = \frac{18,4}{77,6} = 0,23.$$

Rappelons ici que le résidu minéral de l'os des mammifères est représenté en majorité par du phosphate de calcium, sa composition étant la suivante :

12 % ..... $CaCO_3$
86 % ..... $Ca_3\ (PO_4)_2$
1 % ..... $Mg_3\ (PO_4)_2$

$$\frac{Ca\ CO_3}{Ca_3\ (PO_4)_2} = \frac{12}{86} = 0,14.$$

$$\frac{Ca_3\ (PO_4)_2}{Ca\ CO_3} = \frac{86}{12} = 7,16.$$

En comparant les rapports du carbonate de calcium au phosphate de calcium et réciproquement du phosphate de calcium au carbonate de calcium, dans les gastrolithes et la carapace de l'Astacus et dans les os des mammifères, on a :

	Astacus		Mammifères
	gastrolithes	carapace	os
$\frac{CaCO_3}{Ca_3\ (PO_4)_2}$	64,3	4,3	0,14
$\frac{Ca_3\ (PO_4)_2}{CaCO_3}$	0,015	0,23	7,16
	excès de carbonates		excès de phosphates

Nous insistons sur cette différence, parce que si chez les mammifères, où la grande majorité du calcium se trouve précipité sous forme de phosphate tricalcique, la formation de l'os peut être attribuée à la libération du phosphore des éthers phosphoriques par la phosphotase de Robison, chez l'Astacus elle ne peut avoir aucun rôle dans la formation des gastrolithes et un rôle tout à fait insignifiant dans la consolidation de la carapace. Les gastrolithes sont formés presqu'en totalité par du carbonate de calcium et la carapace, elle-même, contient un grand excès de carbonate de calcium.

Quelle est la cause de la précipitation des sels de calcium dans la carapace de l'Astacus ? S'agit-il d'une modification de *p*H ? S'agit-il d'apparition dans la membrane devant se consolider

d'éléments cellulaires capables de fixer le CO_2, selon l'hypothèse de Prenant et de Rapkine ? S'agit-il enfin d'une substance (ferment ?) soluble dans le plasma, favorisant la précipitation de calcium aussitôt que son taux dépasse certaines limites ?

Pour tâcher de répondre à ces différentes hypothèses, nous nous sommes proposé d'étudier :

1° *Les variations du p*H, de la *réserve alcaline,* du *calcium,* du *magnésium* et du *phosphore* dans le PLASMA et dans le CONTENU STOMACAL de l'Astacus deux mois avant la chute de la carapace, immédiatement avant la chute de la carapace, immédiatement après la chute de la carapace, après le début de la consolidation et après consolidation complète.

2° *Les modifications cytologiques* éventuelles de la membrane d'écrevisse au moment de la mue.

3° L'action précipitante *in vitro* du plasma d'écrevisse en période de mue sur la solution d'un sel soluble de calcium.

1° L'étude des variations des différents éléments nous a montré que :

*a) Le p*H du sang de l'Astacus à l'état normal varie entre *7,7 et 7,8.* Pendant la période de consolidation, il s'élève à des valeurs égales à *8,2-8,3.*

Le *p*H du contenu stomacal se maintient aussi bien en temps normal qu'au moment de la mue, entre 5,4 et 5,6.

b) LA RÉSERVE ALCALINE du *sang* d'écrevisse varie, à l'état normal, entre *36,4* et *37,2* centimètres cubes de CO_2 (à 0° et 760 millimètres de pression) pour 100 centimètres cubes de sang.

Elle augmente à l'approche de la mue, atteint les plus grandes valeurs immédiatement avant la mue, *67,2-64,9* centimètres cubes de CO_2 % centimètres cubes de sang; baisse immédiatement après la chute de la carapace à des valeurs allant de *44,3 à 48,1,* et revient complètement aux valeurs normales deux mois après la calcification.

La réserve alcaline *du contenu stomacal* est, aussi bien en temps normal qu'en temps de mue, extrêmement faible ; elle varie entre *10,7 et 14,7* centimètres cubes de CO_2 % centimètres cubes de contenu stomacal.

c) Le taux du calcium varie *dans le sang* de l'Astacus, à l'état normal, entre *40 et 43* milligrammes pour 100 centimètres cubes. Pendant la période de mue, il s'élève et s'abaisse alternativement en oscillant entre *36 et 50 milligrammes* pour 100 centimètres cubes, aussi bien avant la chute de la carapace (pendant la forma-

tion des gastrolithes) qu'après la chute de la carapace (pendant la consolidation de la nouvelle carapace). Nous avons trouvé le chiffre le plus élevé, *68 milligrammes %*, dans le sang d'une écrevisse, immédiatement avant la chute de la carapace. Le sang semble bien, comme nous le disions dans le chapitre précédent, n'être chez l'Astacus qu'un vecteur qui transporte le calcium, au fur et à mesure des nécessités, vers les endroits devant se consolider.

Le calcium soluble dans le *suc stomacal* varie, en temps normal, entre des limites assez approchées de celle du sang. Il s'élève, par contre, dans la période de calcification, jusqu'à *200 milligrammes* pour 100 centimètres cubes.

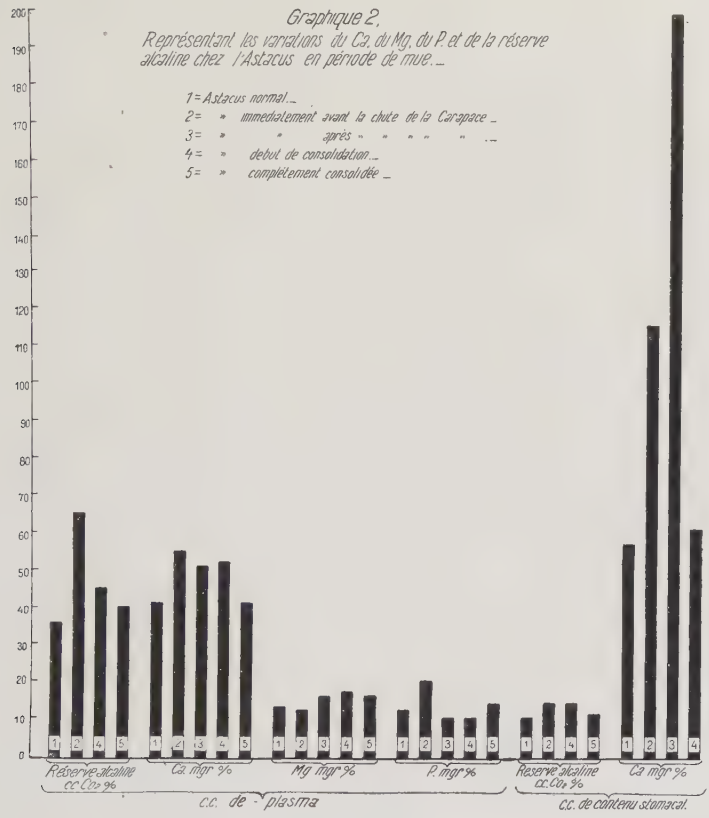
d) Le taux *du magnésium* trouvé dans le sang de l'Astacus normal est beaucoup plus bas que celui du calcium. Il varie entre *12,8 et 14 milligrammes* par 100 centimètres cubes. Il s'élève légèrement pendant la consolidation de la nouvelle carapace et se maintient entre *15 et 18 milligrammes*, jusqu'à consolidation complète.

e) Le phosphore du sang d'Astacus ne présente pas de modifications importantes pendant la période de mue; variant en temps normal entre 13 et 21 milligrammes pour 100 centimètres cubes de sang, il se maintient, pendant la consolidation, entre 10 et 12 milligrammes pour 100.

Tableau *résumant les variations de la réserve alcaline, du* Ca, *du* Mg, *et du* P *dans le sang et le contenu stomacal de l'écrevisse en train de muer :*

	Plasma					Contenu stomacal		
			Ca, Mg, P					
	pH	Réserve alcaline, cc. CO_2 %	mmgr. % cc. de plasma			pH	Réserve alcaline, cc. CO_2 %	Mmgr. calcium %
Normal	7,7-7,8	36,4-37,2	40,43	114	12,9	—	10,7	58
Immédiatement av. la chute de la carapace...	7,7-7,8	67,2-64,9	44,4-68	12,8	21	5,6	14,7	62
Immédiatement apr. la chute de la carapace...	8,1-8,2	44,3-48,1	48-56	15-17	10-12	5,6	14,7	117,2
Début de consolidation ...	7,7-7,8	— —	47-59	18	11	5,6	—	200
Consolidation terminée	7,7-7,8	40,6	42	17	14,7	—	12	—

Graphiques *représentant les variations de la réserve alcaline, du calcium, du magnésium et du phosphore dans le sang et le contenu stomacal de l'Astacus à la mue :*



2° Modifications cytologiques qui se produisent dans le tégument de l'Astacus au moment de la mue.

La structure normale du tégument des crustacés décapodes et ses modifications au cours de la mue n'ont guère été étudiées depuis les travaux déjà anciens de Vitzou.

Nous avons repris ce travail surtout dans l'intention de poursuivre le transport des sels de calcium vers la nouvelle carapace, et de voir s'il y a des modifications cytologiques importantes qui précèdent ou accompagnent la précipitation de sels de chaux dans la cuticule.

Pour réaliser cette étude, nous nous sommes servi de la technique suivante :

Fixation. — a) *Dubosq-Brazil* : 150 centimètres cubes d'alcool 80° + 1 gramme d'acide picrique + 60 centimètres cubes de formol à 40 % + 15 grammes d'acide acétique cristallisable *pour l'étude cytologique.*

b) *Alcool 90°* additionné de *10 % de formol* du commerce préalablement neutralisé *pour suivre la précipitation des sels de chaux dans la nouvelle carapace.*

Inclusion à la paraffine; coupes de 5 à 6 micra.

Coloration. — a) *Hæmotoxyline-éosine* pour l'étude cytologique.

b) *Méthode de Grandi et Mainini* (pour l'étude de la déposition des sels de chaux insolubles) que nous décrirons brièvement.

Après fixation à l'alcool formolé neutre, inclusion dans la paraffine sans passage par l'eau. Après élimination de la paraffine et du toluol, les coupes sont immergées dans une solution saturée de *purpurine* dans l'alcool à 90°. Après une heure environ, on les immerge dans une solution à 8 ‰ de chlorure de sodium. En présence de sels de calcium insolubles, le chlorure de sodium précipite la purpurine. Lavage à l'alcool à 70°, jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de petits nuages de couleur. Double coloration, si l'on veut, au bleu de méthylène.

Résultats : toute la préparation apparaît colorée en bleu, seuls les endroits où existent des sels de calcium précipités sont fortement colorés en rouge.

Téguments de l'Astacus à l'état normal (fig. 1).

A l'état normal, les téguments de l'Astacus comprennent essentiellement, en allant de l'extérieur vers la profondeur, la série de couches suivante :

1° *La cuticule chitineuse* composée elle-même de plusieurs couches :

a) Une pellicule incolore.

b) Une cuticule éosinophile sans structure apparente.

c) Une couche plus profonde comprenant environ les 4/5 de l'épaisseur totale de la cuticule de structure lamelliforme, et présentant en outre une striation transversale en palissade. Celle-ci se divise à son tour en trois portions : une première se colorant intensément, mais assez irrégulièrement en violacé; une

deuxième formée de 8 à 9 lamelles plus lâches se colorant en rose, et enfin la troisième qui ne diffère de la deuxième que par le fait que sa structure lamellaire est beaucoup plus dense.

d) Une couche profonde, immédiatement superposée à l'épithélium de structure lamelliforme, à lamelles parallèles à la surface, et *dépourvue de striations transversales.*

2° *Un épithélium* composé de cellules de petites dimensions, de formes assez irrégulières à cytoplasma *très peu* vacuolaire. Très compact, très dense, non lacunaire.

3° *Un tissu conjonctif* assez dense (derme), au sein duquel sont creusées un certain nombre de lacunes sanguines.

4° *Une fine cuticule chitineuse* interne sous-jacente à un mince endothélium qui délimite la face profonde du derme.

On observe, de place en place, des piliers cellulaires transversaux, interposés entre les deux cuticules (extérieure et intérieure), ayant la forme de deux cônes, opposés par les sommets (piliers en diabolo) et dont le rôle est encore discutable.

Téguments de l'Astacus après la chute de la carapace.

Au moment que se produit la chute de la carapace (fig. 2), *les cellules épithéliales* augmentent rapidement de volume, se gonflent, prenant d'abord un aspect cuboïde, se creusent de vacuoles de plus en plus nombreuses; sous la pression du liquide intravacuolaire, les cellules épithéliales se distendent considérablement dans le sens de la profondeur.

En même temps, les espaces lacunaires du *derme* se remplissent de liquide et finissent par constituer de véritables lacs qui occupent toute l'épaisseur du derme. Jusqu'ici, la portion de la cuticule externe adjacente à l'épithélium à conservé sa structure lamellaire primitive.

A un stade un peu plus avancé (fig. 3), un changement caractéristique se produit dans la structure du cytoplasma épithélial; ce dernier se dispose sous forme de fibrilles denses parallèles entre elles, allant de la superficie vers la profondeur de la cellule; ces fibrilles laissent subsister entre elles une série de canalicules intracellulaires occupant toute la longueur de la cellule. Vers la profondeur, ces canalicules semblent s'ouvrir dans les espaces lacunaires du derme. Vers la surface, ils viennent déboucher à la face profonde de la cuticule lamellaire.

A ce moment, une transformation apparaît au sein de cette

dernière, sous forme d'une striation transversale absente jusque-là, et identique à celle que nous avons décrite plus haut.

Cette striation en palissade, nouvellement apparue, présente ceci de remarquable que les espaces canaliculés (séparés par des septa) qui la constituent, sont disposés de telle façon que chacun d'entre eux se trouve situé dans le prolongement des canaux épithéliaux, les septa étant situés eux-mêmes en prolongement des fibrilles intracellulaires.

Les cellules qui constituent les colonnades en diabolo participent à la fibrillation générale de l'épithélium aussi bien du côté extérieur que du côté intérieur. En même temps, ces colonnades semblent être beaucoup plus fréquentes dans le tégument de l'Astacus au moment de la mue que dans celui de l'Astacus normal.

On voit de plus apparaître en très grand nombre, dans l'intérieur des vaisseaux sanguins contenus dans le tissu conjonctif, de grands éléments à cytoplasma légèrement éosinophile, appartenant au groupe des néphrocytes de Cuénot.

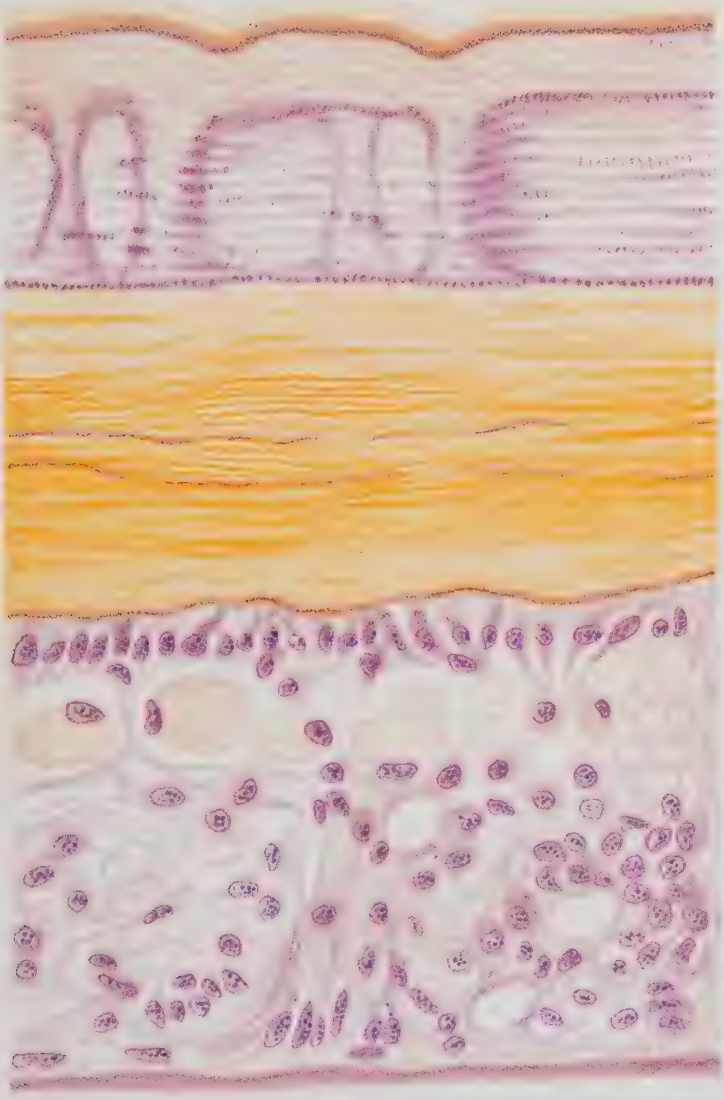
A ce moment, les gastrolithes sont intactes et la coloration à la purpurine est négative.

A un stade un peu plus avancé (fig. 4), la striation fibrillaire de l'épithélium commence à disparaître, les vacuoles intracellulaires ont tendance à se masser immédiatement sous la cuticule et à former un chapelet de petites vacuoles pressées les unes contre les autres. Les lacunes du tissu conjonctif sont énormes, distendues de liquide et envahies par les grosses cellules ou néphrocytes de Cuénot. Des colorations spéciales (iode Ca Cl_2) nous ont montré qu'elles étaient chargées de glycogène.

A un stade encore plus avancé (fig. 5), lorsque la réserve calcaire a commencé à diminuer, on voit apparaître, dans la cuticule, une bande colorée en rouge par la purpurine. Le calcium se dépose irrégulièrement en formant deux bandes continues, une plus grosse vers l'extérieur et une deuxième un peu plus mince vers l'intérieur, immédiatement au contact de l'épithélium, et entre elles des colonnes irrégulières qui traversent toute la largeur de la cuticule. L'épithélium a perdu en grande partie sa vacuolisation.

Enfin, au moment où les gastrolithes ont été épuisés, la cuticule apparaît fortement imprégnée de sels insolubles de calcium, et les cellules épithéliales, de même que le derme, ne tardent pas à reprendre leurs dimensions et aspect primitifs.

Il résulte de l'ensemble de ces observations que, pendant les quelques heures qui accompagnent et suivent la chute de l'an-



Imp. Lafontaine, Paris

Boisgonlier. Dess.

Masson & Cie Editeurs

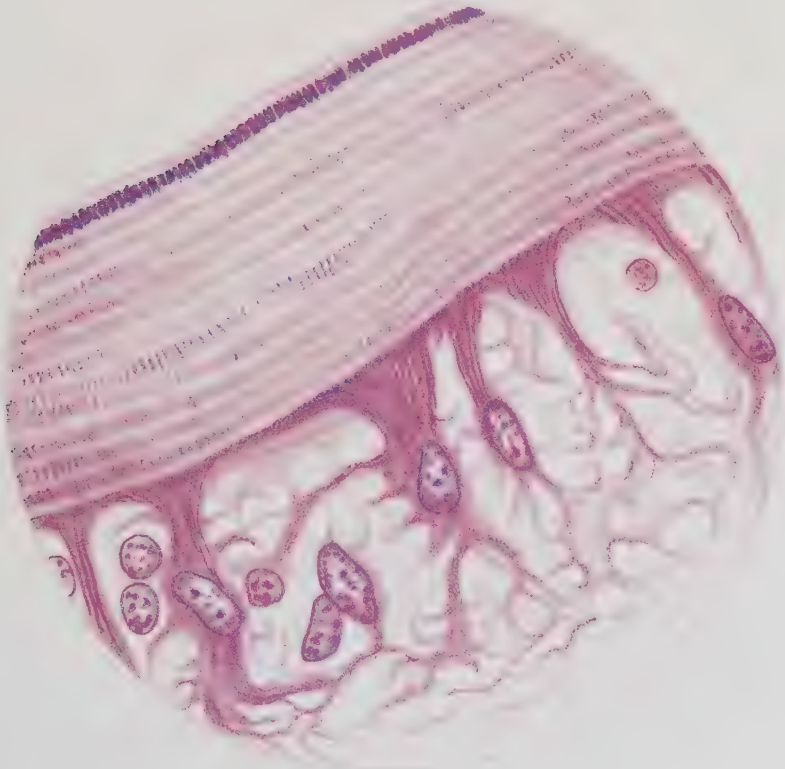
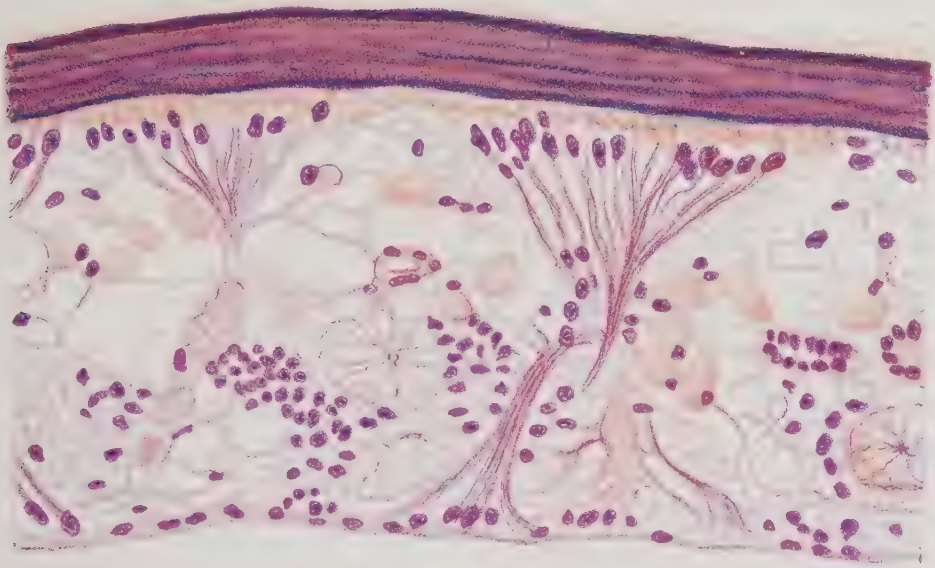


Fig. 3

Imp. Lafontaine, Paris

Boisgontier. Dess.

Masson & Cie Editeurs



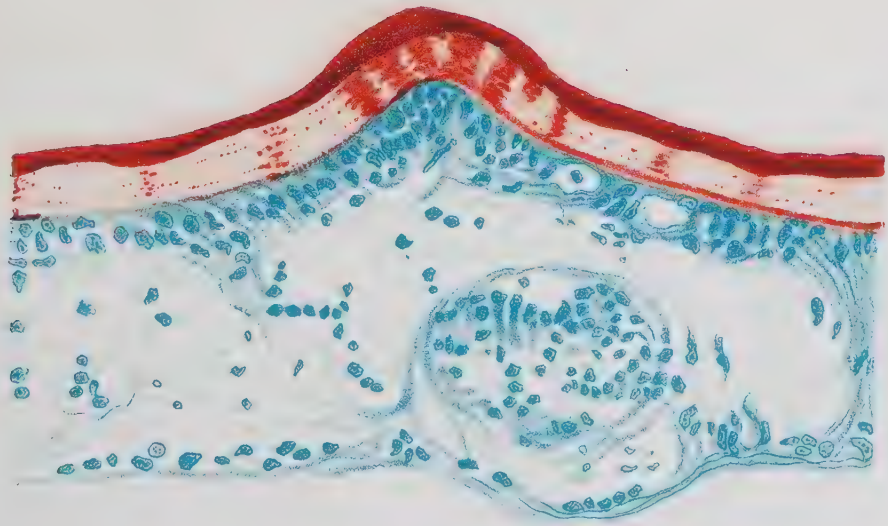


Fig 5

Imp. Lafontaine, Paris

Boisgontier. Dess

Masson & C^ie Editeurs

cienne carapace, les téguments de l'Astacus, c'est-à-dire la nouvelle cuticule, l'épithélium et le derme s'organisent de la sorte qu'une véritable circulation puisse s'établir entre les lacunes du derme d'une part, et les canaux intracellulaires de l'autre. Les sels de chaux à l'état soluble sont transportés par le sang dans les lacunes du derme, et de là puisés par les cellules épithéliales et déversés à l'intérieur de la cuticule chitineuse, par l'intermédiaire des canaux en palissade apparus au sein de cette dernière.

Une dernière question se pose : par quel mécanisme se forment, dans l'intérieur de la couche lamellaire, les canalicules qui prolongent les canalicules intracellulaires et dont elle était privée jusque-là ? Il est permis de supposer qu'un double processus intervient ici : peut-être un processus de ramollissement de la cuticule, grâce auquel vient se surajouter une action de pression mécanique (vis à tergo) provoquée par le courant qui, à travers les canaux intracellulaires, va de la profondeur vers la surface externe.

3° Action précipitante *in vitro* du plasma d'*Astacus fluviatilis* en période de mue sur une solution de chlorure de calcium.

Pour étudier l'action précipitante *in vitro* du plasma d'Astacus sur les sels solubles de calcium, nous avons imaginé la technique suivante :

Une solution de chlorure de calcium à 1 % centimètres cubes était répartie dans des tubes à hémolyse, à raison de 1 centimètre cube pour chaque tube. On y ajoutait une à deux gouttes de sang total d'Astacus, aussitôt après sa sortie du corps (récolté par la ponction d'une des pattes), ou, lorsqu'il nous était possible de récolter de plus grandes quantités de sang, une à deux gouttes de plasma citraté ou du sérum (sang défibriné). On notait, si elle avait lieu, l'apparition instantanée d'un trouble ou la formation d'un précipité au bout de quelques heures.

Voici les observations que nous avons pu faire :

Le plasma d'Astacus normal, ou immédiatement avant la chute de la carapace, *ne trouble jamais* la solution de chlorure de calcium *in vitro,* même si l'on ajoute, à 1 centimètre cube de $Ca\,Cl_2$, un excès, c'est-à-dire cinq à six gouttes de sang, de plasma citraté ou du sérum.

Il en est de même du contenu stomacal.

Par contre, une seule goutte, parfois, du sang d'un Astacus en

train de consolider sa carapace, est suffisante pour troubler fortement la solution de $Ca\,Cl_2$ et provoquer, au bout de quelques heures, la formation d'un abondant précipité *amorphe*.

En saignant toutes les deux heures la même écrevisse, pendant la période de calcification, nous avons constaté que cette propriété précipitante du sang ne se manifestait pas constamment, le phénomène se passait comme si le ferment ou cette propriété précipitante apparaissait et disparaissait de la circulation selon les nécessités de la précipitation ou de la solubilisation du calcium.

Nous avons observé, en plus, que le sang des animaux qui meurent au bout de douze à vingt-quatre heures après la chute de leur carapace, et qui n'arrivent pas à consolider leur nouvelle carapace, *ne trouble jamais* la solution de chlorure de calcium *in vitro*. En sacrifiant les mourants, nous avons eu la surprise de voir qu'ils avaient pourtant épuisé complètement, ou en partie, leurs réserves calcaires. Les sels de chaux avaient donc été solubilisés, transportés vers la cuticule sans pouvoir être précipités. L'incapacité de consolider leur carapace semble bien être due, chez ces animaux, à l'absence dans leur plasma du pouvoir ou du ferment précipitant *in vitro* le $Ca\,Cl_2$.

Comme nous avions constaté que le *p*H du sang d'Astacus s'élève, pendant la consolidation, de 7,8 à 8,1-8,3, et comme nous avions vu en plus qu'à un *p*H égal à 8,4, les sels de chaux qui forment la réserve calcaire sont presque insolubles, nous avons ajouté à la solution de chlorure de calcium *in vitro* des mélanges tampons dont le *p*H variait entre 8,1 et 8,4. Leur action précipitante s'est montrée nulle. L'action précipitante *in vitro* du plasma d'Astacus, sur les sels solubles de calcium, n'est donc pas due à l'élèvement du *p*H qui se manifeste en même temps.

Cette première série d'expériences prouve *que le plasma des écrevisses qui sont en train de consolider leur nouvelle carapace, acquiert* PÉRIODIQUEMENT *la propriété de donner* in vitro *un trouble, suivi de la formation d'un précipité amorphe, avec une solution de* $Ca\,Cl_2$ *à* 1 %.

Peut-on observer un phénomène analogue, pendant la consolidation d'une fracture osseuse, chez les hommes et chez les animaux ? Cette question s'imposait à nous d'autant plus que l'action stimulante du sérum des malades et convalescents de fractures osseuses, dans la guérison des consolidations retardées, avait été signalée par plusieurs auteurs.

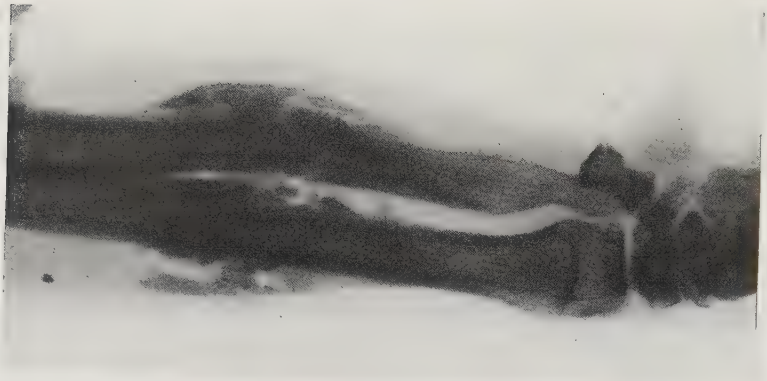
C'est le chien que nous avons choisi comme animal d'expérience.

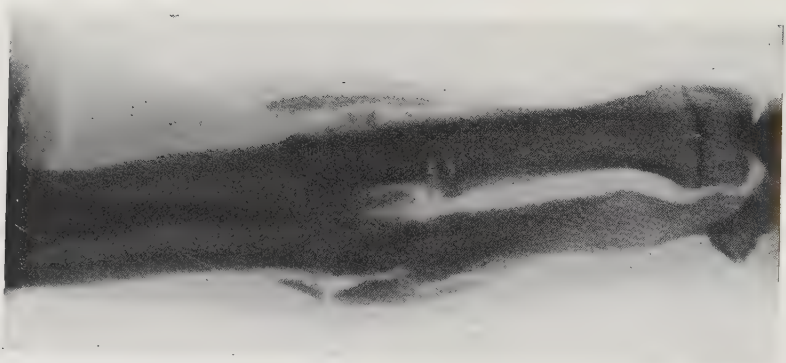
Deux mâles, relativement jeunes (un à deux ans), ont été saignés préalablement, afin de déterminer la réserve alcaline, ainsi que le contenu en Ca, en Mg et en P de leur plasma. On examinait, en même temps, l'action précipitante du plasma citraté et du sérum sur la solution à 1 % de $Ca\,Cl_2$ *in vitro*.

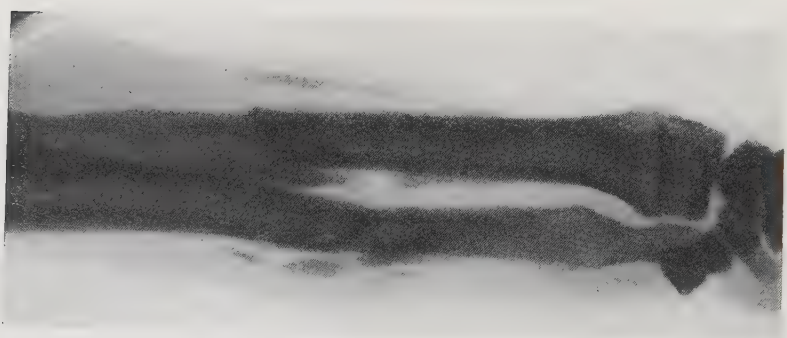
Après légère anesthésie, les *cubitus et radius* droits des mêmes animaux ont été fracturés et les fractures immobilisées avec des attelles. Les malades gardés à vue et nourris normalement furent saignés, toujours à jeun, tous les deux ou trois jours au début, et journellement sept à huit jours après la fracture.

On pratiquait sur le plasma, débarrassé des éléments figurés, le dosage de la réserve alcaline, du calcium, du magnésium et du phosphore, et l'on examinait en même temps son action précipitante sur la solution $Ca\,Cl_2$.

L'expérience a duré trente jours. Au bout de ce temps, les animaux avaient repris l'usage des membres blessés, et la radiographie montrait une réelle intensification de la calcification du cal osseux. (Voir page 64.)







Les résultats de nos recherches sont groupés dans le tableau suivant :

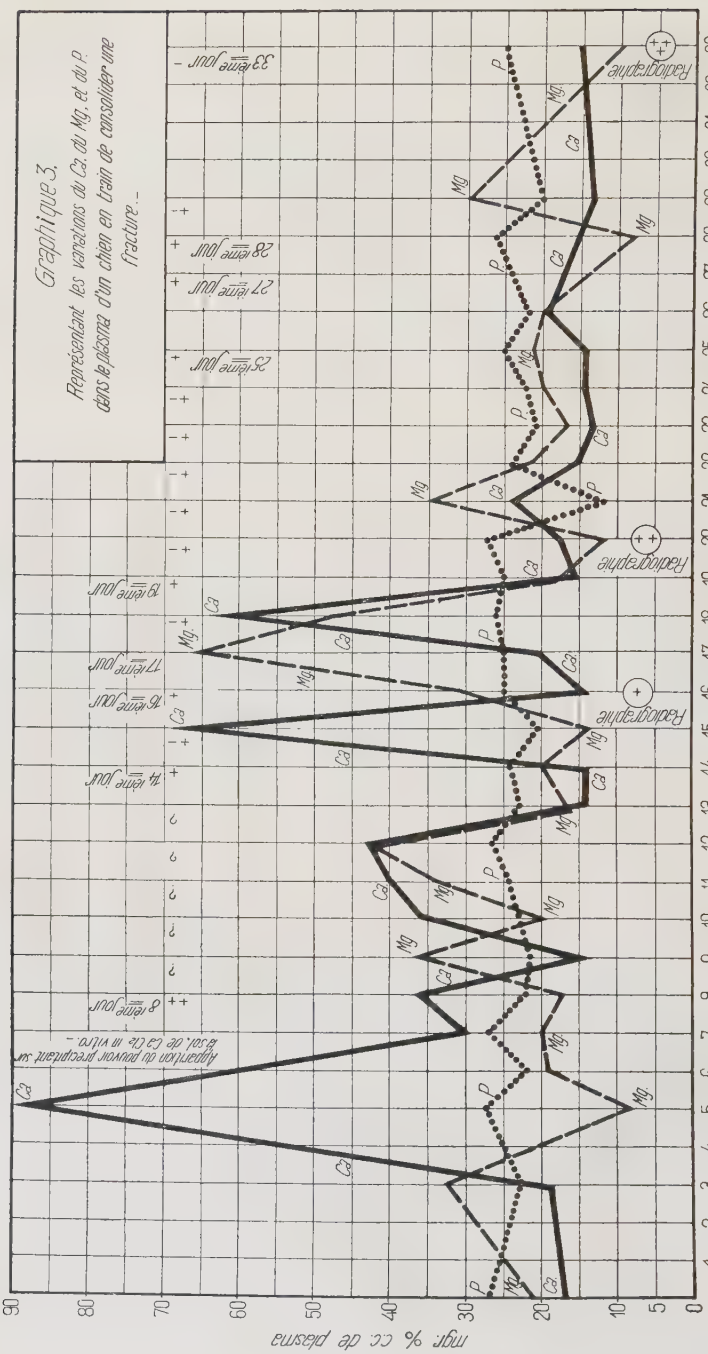
TABLEAU

Ca, Mg, P, *réserve alcaline et pouvoir précipitant du plasma de chien pendant la consolidation d'une fracture osseuse :*

Date de saignée et fracture	Ca, Mg, P (mmgr. 0/0 cc. de plasma)			Réserve alcaline (cc. de Co_2 0/0, cc. de plasma)	Ca×Mg (gr.)	Ca×P (gr.)	Ca×Mg×P (gr.)	Pouvoir précipitant sur la solution à 1 0/0 de $CaCl_2$ *in vitro*
9 déc. 1931	17,2	21,7	26,5	33,8	0,37	0,46	1	—
Temps de fracture								
3 jours..	18,4	32,4	22,9	39	0,50	0,41	1,33	—
5 — ..	90	8,5	27,5	42,4	0,76	*2,48*	*2,10*	?
7 — ..	29,6	19,6	22	36,2	0,58	0,65	1,27	?
8 — ..	37,2	17	27	37,8	0,63	1	1,70	++
9 — ..	14	36,7	22	45,7	0,50	0,31	1,14	?
10 — ..	36	19,6	23	37,2	0,71	0,83	1,63	?
11 — ..	40	34,2	24	43,5	1,37	0,96	3,28	?
12 — ..	43	42,7	26,5	37,2	1,84	*1,14*	*4,87*	?
13 — ..	14	17	22,9	48,2	0,24	0,33	0,56	?
14 — ..	14	18,8	24	37,2	0,25	0,34	0,64	+
15 — ..	67	14,5	19,7	39	0,97	1,32	1,91	+—
16 — ..	14,4	31	25	47,5	0,43	0,36	1,13	+
								radiogr. (+)
17 — ..	20	66	25	41,9	1,32	0,50	3,30	+
18 — ..	62	48	25,4	41,6	3,02	*1,57*	*7,53*	+—
19 — ..	14,8	17	25	47,5	0,24	0,37	0,63	+
20 — ..	16,8	13	27	41,9	0,21	0,45	0,59	+—
								radiogr. (++)
21 — ..	24	34,2	12	42,9	0,82	0,53	1,81	+—
22 — ..	15,2	21,3	24	34,6	0,32	0,36	0,77	+—
23 — ..	12,8	17	21	46,5	0,30	0,27	0,44	+—
24 — ..	14	20	21,8	42	0,28	0,31	0,61	+—
25 — ..	14	21	25,4	45,8	0,30	0,36	0,74	+
27 — ..	19,2	20	21,8	38,7	0,38	0,42	0,84	+
28 — ..	13,2	8,5	26,5	40,6	0,11	0,35	0,30	+
29 — ..	13,2	29	20	40,1	0,38	0,26	0,75	+—
33 — ..	15	20	25	—	—	—	—	—
								radiogr. (+++)

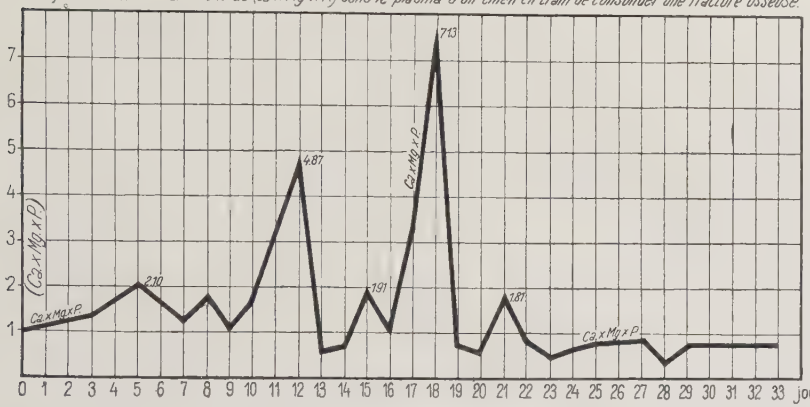
Légende : — absence d'action sur la solution de $CaCl_2$.
? opalescence à peine perceptible.
+— opalescence extrêmement faible.
+ opalescence nette.
++ opalescence immédiate suivie de la formation d'un précipité indosable au bout de quelques heures.

Radiographie : (+) début de précipitation des sels de calcium.
(++) précipitation des sels de calcium intensifiée au niveau du cal osseux.
(+++) précipitation des sels de calcium très intense.


Graphique 3.
Représentant les variations du Ca, du Mg, et du P. dans le plasma d'un chien en train de consolider une fracture.
mgr. % c.c. de plasma
Jours passés après la fracture des os.
Radiographie
Radiographie
Radiographie
Ca
Mg
P

Graphique 4.

Représentant les variations de (Ca x Mg x P) dans le plasma d'un chien en train de consolider une fracture osseuse



L'examen du tableau et des graphiques qui précèdent nous montre que la quantité d'ions de *calcium* et de *magnésium* solubles dans le plasma d'un chien qui consolide une fracture osseuse varie considérablement, en présentant des hausses et des baisses étonnantes, dans les premiers dix-huit jours.

Lorsque la radiographie indique qu'il y a un début de précipitation des sels de calcium au niveau du cal osseux, ses variations s'atténuent. Elles deviennent de plus en plus insignifiantes à mesure que la calcification de la fracture s'intensifie.

Le phosphore, par contre, reste dans les limites normales; il ne dépasse qu'à peine la limite supérieure et, souvent même, baisse nettement au-dessous de la limite inférieure.

En multipliant les ions de Ca et de Mg, de Ca et de P, et enfin de Ca, de Mg et de P, on obtient des chiffres qui mettent encore mieux en évidence l'allure générale de ces variations.

Si l'on considère, en effet, le produit des trois ions, c'est-à-dire $Ca \times Mg \times P$ (graph. 4), on constate que, tandis qu'au début de la consolidation les chiffres obtenus présentent des écarts considérables en s'élevant (4,57-7,53) et s'abaissant (0,56-0,64) à tour de rôle, au-dessus et au-dessous de la normale (1), après le dix-huitième jour, ils ne présentent plus que de très petites variations, se maintenant même à des valeurs relativement basses.

La réserve alcaline est plus élevée pendant toute la durée de la consolidation; elle présente, en général, des maxima les jours où il y a eu une baisse brusque du calcium ou du magnésium.

Quelle est maintenant l'action du plasma sur la solution de *chlorure de calcium in vitro* ?

Aussi bien avant que pendant les trois premiers jours après la fracture des os, le plasma d'un chien ne trouble pas la solution de Ca Cl_2 *in vitro*. Vers le huitième jour, on voit apparaître un louche évident, dès qu'une goutte de plasma vient en contact avec la solution de Ca Cl_2. Au bout de dix à douze heures, il se forme un précipité indosable. Les jours suivants, cette réaction s'atténue ou s'intensifie pour ne disparaître complètement que trente-trois jours après que les os ont été fracturés, lorsque le processus de la consolidation semble complètement terminé.

Il semble, en général, que dans le phénomène de la calcification chez l'écrevisse, comme chez le chien, le sang transporte le calcium qu'il prend soit aux réserves calcaires, soit au reste de l'organisme, vers les endroits qui doivent se consolider. Là il s'accumule, grâce à la faculté que possèdent le cartilage et probablement la cuticule chitineuse d'absorber de grandes quantités de sels solubles de chaux. Lorsque l'accumulation est arrivée à un maximum, apparaît cette substance qu'on retrouve périodiquement dans le plasma sanguin qui favorise la précipitation des sels de calcium.

A une première précipitation suit une mobilisation et un nouveau transport de sels de chaux, puis une nouvelle apparition du pouvoir précipitant qui provoque à son tour une nouvelle précipitation des sels de chaux, et ainsi de suite jusqu'«à saturation complète et définitive du cartilage ou de la chitine par les sels solubles de chaux.

Comment expliquer l'apparition de ce pouvoir précipitant dans le plasma des animaux en train de consolider une fracture ?

S'agit-il d'une modification de l'équilibre physico-chimique du plasma ? S'agit-il d'un ferment sécrété par les cellules de l'organisme ?

Au moment où nous faisons cette publication, nous ne possédons pas encore les preuves nécessaires pour affirmer qu'il s'agit d'une action de ferment.

Une première série d'essais nous a tout de même permis de voir que cette propriété précipitante du plasma se conserve intacte après un séjour d'une semaine à la glacière. Après un chauffage d'une demi-heure à 55°, le plasma trouble encore la solution de Ca Cl_2 *in vitro,* mais son pouvoir précipitant est très réduit, car en dosant le calcium resté en solution après l'action du plasma chauffé et non chauffé, nous avons constaté qu'après le chauffage le pouvoir précipitant du plasma était réduit de moitié.

NOTE ADDITIONNELLE

1° Variations provoquées par les saignées, les hémorragies, la maladie ou une inoculation quelconque dans la composition du liquide intérieur chez les crustacés décapodes.

2° Modification de la composition du liquide intérieur chez les *crabes parasités par la sacculine.*

Il nous est fréquemment arrivé, en étudiant le liquide intérieur des Astacus ou des Maïas, dans les premières heures qui suivent la mue, de voir que l'indice réfractométrique, ainsi que le taux des protéines coagulables par la chaleur, baissait beaucoup au-dessous des valeurs normales.

Chez l'Astacus, le taux des protéines revient généralement, deux à quatre heures après la chute de la carapace, à la normale (3 à 5 grammes pour 100 centimètres cubes). Pourtant, chez certains animaux, nous avons récolté, après la mue, un liquide intérieur qui ne contenait plus que 1,5 gr. de substances protéiques % centimètres cubes. Fait intéressant à noter, aussi longtemps que la carapace n'a pas commencé à durcir, malgré la pauvreté du liquide intérieur en substances protéiques, il coagule encore très fortement.

De même des Maïas, ayant une carapace incomplètement calcifiée, avaient parfois un liquide intérieur très pauvre en protéines coagulables par la chaleur (0,3 à 0,5 gr. %, au lieu des valeurs normales, 1,52-3,55 gr. %). Chez ces animaux, l'hémocyanine n'existait plus qu'à l'état de traces, la totalité des protéines présentant les caractères des pseudoglobulines.

Les animaux *abondamment saignés* présentent eux aussi une baisse appréciable du taux de leurs protéines coagulables par la chaleur.

Voici des expériences qui confirment ces affirmations :

Expérience 19. — Deux Astacus de taille moyenne sont saignés. On prélève, à chacun d'eux, 3 centimètres cubes de liquide intérieur. L'un des animaux (1) est gardé à sec, l'autre dans un bac rempli d'eau.

On constate que *la saignée provoque une disparition partielle des substances protéiques du plasma, qui se manifeste à peine ou pas du tout au bout d'une demi-heure, mais devient très nette au bout de vingt-quatre heures,* comme l'indique le tableau suivant :

	Astacus (1)	Astacus (2)
Avant la saignée :		
Divisions de l'échelle réfractométrique ...	43,1	37
Protéines coagulables à 100°	4,60 gr. %	3,28 gr. %
1/2 heure après la saignée :		
Divisions de l'échelle réfractométrique ...	43	36
24 heures après la saignée :		
Divisions de l'échelle réfractométrique ...	35	34
Protéines coagulables à 100°	2,84 gr. %	1,76 gr. %

Il y a donc, chez l'Astacus (1), 38 % des protéines du sang qui ont disparu vingt-quatre heures après la saignée, et, chez l'Astacus (2), 47 % des protéines du sang qui ont disparu vingt-quatre heures après la saignée.

Le taux des cendres restait sensiblement le même et l'Astacus, tenu à sec, présentait une baisse des protéines presqu'aussi grande que celui gardé dans l'eau. Cette diminution de la totalité des protéines ne peut pas être attribuée à la dilution du liquide intérieur par une absorption de l'eau environnante.

Expérience 2. — *Une langouste* de 2900 grammes a été saignée en lui prélevant 120 centimètres cubes de liquide intérieur. Remise dans son bac et ressaignée au bout de deux jours, elle fournit 100 centimètres cubes d'un liquide intérieur, dont l'aspect est parfaitement analogue à celui de la première saignée. De plus, il coagule fortement en formant un coagulum très peu rétractile. Pourtant, l'examen du tableau suivant montre nettement qu'il y a chez la langouste après la saignée, comme chez l'Astacus, une baisse sensible du taux des protéines coagulables par la chaleur.

	1re saignée, gr. % cc. sérum	2e saignée, gr. % cc. sérum
Protéines coagulables à 100°.	8,165	6,850
Hémocyanine	7,045	5,895
Globulines.....	1,120	0,955
Pseudoglobulines	1,12	0,955
Euglobulines (fibrinogène) ..	0	0
Rapport hémocyanine-globulines	6,3	6,1

15 % des protéines ont disparu du liquide intérieur de la langouste, quarante-huit heures après une forte saignée.

Les maladies spontanées, les asphyxies, ou *la simple inoculation d'un antigène quelconque,* provoquent chez l'Astacus des modifications considérables dans la composition du liquide intérieur.

Lorsqu'une écrevisse a séjourné trop longtemps dans une eau mal aérée, son sang change complètement d'aspect. Il devient *incoagulable,* ne bleuit plus au contact de l'air; le taux des protéines solubles baisse jusqu'à 0,5 gr. %, l'indice réfractométrique ayant au même moment une valeur égale à 28 divisions de l'échelle réfractométrique.

Trois Astacus (1) (2) (3), de grande taille, dont le liquide intérieur avait un indice compris entre 34,2 et 35,6 divisions de l'échelle réfractométrique, reçoivent, dans la cavité générale, par ponction d'une des pattes, 1 centimètre cube de suspension 1/20 de globules rouges de mouton lavés dans du sérum physiologique.

L'Astacus (1) est saigné cinq minutes, le (2) une demi-heure et le (3) vingt-quatre heures après cette inoculation.

On examine le sang de ces animaux entre lame et lamelle au microscope, on détermine l'indice réfractométrique, les protéines totales coagulables à 100°, l'hémocyanine et les globulines.

On constate, à l'examen microscopique, que *cinq minutes* après l'inoculation des globules rouges de mouton, les éléments figurés propres au sang de l'animal ont presque complètement disparu de la cavité générale, tandis que l'on y trouve encore une quantité assez grande des globules rouges injectés. *Après une demi-heure,* les éléments propres du sang d'Astacus n'ont pas encore reparu. On observe de rares hématies de mouton. *Après vingt-quatre heures,* les éléments figurés du sang ont réapparu en grand nombre; les globules rouges de mouton ont, par contre, complètement disparu.

Le liquide intérieur de ces animaux est incolore, il bleuit difficilement au contact de l'air, sa coagulation est fortement retardée (quatre jours).

Les protéines coagulables à 100°, ainsi que les différentes fractions, baissent de la manière suivante :

Après l'injection de globules rouges de mouton, gr. % cc. :

	Avant l'injection, division échelle réfracto-métrique	Division échelle réfracto-métrique	Protéines totales	Hémo-cyanine	Globulines	Cendres
Astacus :						
(1)	34,2	29,4	1,60	0,25	1,35	1,55
(2)	35,6	31	1,96	0,40	1,56	1,30
(3)	37	33,4	2,48	1	1,48	1,55

Il ressort de cette expérience qu'à la suite de l'inoculation de doses massives de globules rouges de mouton, le sang de l'Astacus devient, au bout de cinq à trente minutes, presqu'incoagulable, son contenu en protéines s'appauvrit nettement; les éléments figurés propres au sang de l'animal disparaissent presque totalement de la cavité générale.

Au bout de vingt-quatre heures, l'équilibre se rétablit en partie; les jours suivants, on voit apparaître un très grand nombre d'éléments figurés; le taux des albumines, de bas qu'il était, tend à redevenir normal.

Comment expliquer la facilité avec laquelle est modifiée la composition du liquide cavitaire chez les crustacés décapodes ? S'agirait-il de phénomènes dus à l'excitation d'un système végétatif rudimentaire existant chez ce groupe d'animaux ? Nous préférons rapporter nos observations, sans nous aventurer plus loin dans des considérations trop hardies.

Modifications de la composition du liquide intérieur chez les Carcinus mænas parasités par la sacculine.

Nous exposerons enfin, avant de passer aux conclusions de cette étude, les résultats de nos recherches comparatives sur le liquide intérieur des crabes normaux, sacculinés et ayant perdu leur sacculine.

	Crabes normaux		Crabes sacculinés		Crabes ayant perdu leur sacculine externe	
	éloignés de la mue	au voisinage immédiat de la mue	éloignés de la mue	au voisinage immédiat de la mue	éloignés de la mue	au voisinage immédiat de la mue
Protéines coagulables à 100°.	2,20	5,30	2,75	7,75	3,30	7,95
Hémocyanine ..	0,73	2,17	1	3,30	0,38	3
Globulines	0,67	2,80	1,49	4,27	2,92	4,62
Pseudoglobulines	0,31	2,13	0,95	3,31	2,32	3,90
Euglobulines ..	0,50	0,70	0,54	0,96	0,60	0,72
Viscosité	1,35	1,55	1,45	1,75	1,60	1,70

La totalité des substances protéiques coagulables à 100° augmente donc dans le liquide intérieur des crabes sacculinés. Cette augmentation est encore plus évidente chez les animaux qui ont perdu leur sacculine externe.

Il est fort probable que l'intoxication produite par la sacculine interne provoque, de la part de l'hôte, des réactions de défense qui sont plus marquées après la chute de la sacculine externe, lorsque les racines internes finissent par être résorbées. Cette défense se traduit par l'augmentation des substances protéiques et surtout de la fraction pseudo-globuline dont le taux s'élève de 0,31 à 2,13 gr. chez les crabes éloignés de la mue, et de 2,12 à 3,90 chez ceux qui sont au voisinage immédiat de la mue.

La viscosité augmente proportionnellement au taux des protéines. L'examen microscopique du sang des crabes normaux, comparativement à celui des crabes sacculinés, nous a permis de voir que, chez les animaux parasités, le nombre des éléments figurés à grandes granulations éosinophiles augmente considérablement en s'élevant de 13 % (crabe normal) à 48 % (crabes sacculinés).

Cette observation a été faite aussi bien chez les mâles que chez les femelles qui ne diffèrent guère entre eux. Les femelles porteuses d'œufs se comportent comme les femelles normales.

L'élévation du nombre des éléments à granulations éosinophiles semble donc être bien caractéristique pour le sang des animaux parasités. Bien que le rôle des granulations éosinophiles chez les crustacés décapodes soit très différent de celui des mêmes granulations chez les mammifères, nous attirons l'attention sur l'analogie qui existe entre le mode de réaction de l'hôte vis-à-vis d'un parasite infestant. Il semble être le même pour les vertébrés que pour les invertébrés.

CONCLUSIONS

L'étude des constantes physico-chimiques du sang des crustacés décapodes, dont nous venons d'exposer les résultats, nous permet de dégager, malgré les lacunes inévitables à un travail que la diversité des problèmes à résoudre rendait difficile, un certain nombre de faits positifs :

1° Les crustacés décapodes peuvent être groupés d'après la composition et les caractères physico-chimiques de leur liquide cavitaire, tout comme d'après leur aspect morphologique, en deux groupes :

a) Le groupe des Macroures ayant pour type : *l'Astacus fluviatilis* qui a fait l'objet principal de nos recherches.

b) Le groupe des Brachyoures ayant pour type : Maïa squinado.

2° Les animaux *des deux groupes* ont un sang relativement pauvre en éléments figurés; ceux-ci, excessivement fragiles chez toutes les espèces étudiées, s'altèrent très vite après la sortie du corps; ils s'agglutinent et forment une masse spongieuse qui surnage dans le liquide parfaitement limpide représentant le plasma. Cette altération, de même que l'agglutination qui s'en suit, ne peut être empêchée que par des anesthésiques, tels que le chlorhydrate de cocaïne ou le chloroforme. Les anticoagulants sont absolument sans action sur ce phénomène, considéré par certains auteurs comme représentant la première phase de la coagulation du sang chez les invertébrés. La substance qui détermine l'accolement des amibocytes et leur groupement en amas agglutinés n'est pas d'origine plasmatique, elle est issue des éléments figurés eux-mêmes.

3° Le plasma limpide qu'on obtient après la séparation spontanée des éléments figurés *reste indéfiniment liquide chez les Brachyoures à l'état normal,* tandis qu'*il coagule en formant un caillot compact très peu rétractile, chez les Macroures.* Ces der-

niers diffèrent donc des premiers par le fait que leur sang présente également la deuxième phase de la coagulation décrite chez les invertébrés. C'est cette deuxième phase qui est comparable en tout à la coagulation du sang des vertébrés. En effet, son apparition est due à la *précipitation*, sous forme de gel, *du fibrinogène* dissous dans le plasma. Cette précipitation se fait en présence des *sels de calcium*, sous *l'action d'un ferment* qui apparaît à la suite de la destruction des éléments figurés. Elle peut être empêchée soit par des substances qui insolubilisent ou bloquent les ions de calcium, soit par des substances qui paralysent l'activité du ferment, comme par exemple les anticoagulants usuels. Le fibrin-ferment du sang des invertébrés n'agit pas sur le fibrinogène des vertébrés et inversement.

4° Les Macroures, aussi bien que les Brachyoures, contiennent, en solution dans le plasma, des quantités notables de protéines coagulables par la chaleur; nous avons réussi à séparer ces dernières en trois fractions :

a) Une première qui présente les caractères du fibrinogène. Elle est relativement hydrophile, car une dialyse de quarante-huit heures, de même que l'action de l'alcool ou de l'acétone, la rendent rapidement insoluble.

La chaleur la coagule à 56°. Son point isoélectrique est compris entre *p*H *5,7 et 6,9*. Le plasma des Macroures contient toujours du fibrinogène; par contre, il est absent ou n'existe qu'à l'état de traces dans le plasma des Brachyoures.

Au moment de la mue, il augmente considérablement chez les Macroures et devient nettement dosable chez les Brachyoures. *Réaction du cuivre négative.*

b) Une deuxième, qui présente les caractères des pseudo-globulines; elle n'existe qu'à l'état de traces dans le plasma. Elle constitue, par contre, la totalité des globulines du sérum et semble apparaître à la suite de gélification du fibrinogène. La chaleur la coagule entre *69° et 75°*. Son point isoélectrique est à *p*H *4,4*. *Réaction du cuivre négative.*

c) Enfin, après l'élimination des deux fractions, il ne reste plus en solution que l'hémocyanine. Elle précipite à 75 % de saturation par le sulfate d'ammonium ou après une dialyse prolongée (huit à dix jours). Elle coagule entre *64* et *65°*, son point isoélectrique est à *p*H 3,6. *Réaction du cuivre nettement positive.*

5° Le taux de ces différentes fractions varie d'une espèce à une autre. Il varie aussi avec les différents états physiologiques d'une même espèce. Ainsi, au moment de la mue, il y a une aug-

mentation considérable du taux des protéines coagulables par la chaleur. Cette augmentation porte surtout sur le fibrinogène.

6° L'équilibre des constituants protéiques du plasma des crustacés décapodes est très facilement détruit. Une hémorragie, une saignée, une injection de corps étrangers, une maladie spontanée, un séjour prolongé dans l'eau mal aérée, sont des conditions suffisantes pour faire baisser considérablement le taux des substances protéiques coagulables par la chaleur.

Il est donc indispensable, avant d'entreprendre une expérience d'immunisation, de contrôler le sang des animaux devant être immunisés (indice réfractométrique, coagulabilité), afin de voir si la composition de leur plasma correspond aux chiffres moyens que nous avons donnés pour les animaux à l'état normal.

7° Le plasma des crustacés décapodes examinés ne contient ni albumoses, ni peptones, ni acides aminés, ni ammoniaque. Il contient des traces d'urée et d'acide urique.

8° Les lipoïdes existent dans le plasma des crustacés décapodes en quantités dosables (0,11, Maïa; 0,50 %-0,59 %, Astacus et Eupagurus). Ils sont représentés par de la cholestérine libre et éthérifiée (0,12-0,70 %), des lipoïdes phosphorés dosables seulement chez les espèces marines, parmi les animaux étudiés; enfin, la majeure partie est formée par le lipochrome qui colore en rouge orangé le sang des animaux de ce groupe.

9° Le sang d'Astacus fluviatilis contient 0,16 à 0,20 gr. de glucose ‰. Un ferment glycolytique semble le détruire, car il disparaît au bout de deux à trois heures après la récolte du sang.

10° Le Δ du sang des crustacés décapodes est égal à 0,60 chez l'écrevisse en temps normal; chez les animaux marins, il varie entre 2,025 et 2,1, alors que le Δ de l'eau de mer à Roscoff est égal à 2,01.

11° Les ferments protéolytiques n'ont pas pu être mis en évidence dans le plasma de l'Astacus. Les éléments figurés décomposent l'eau oxygénée, mais le plasma limpide reste inactif. Pas de lipase. Présence d'une amylase dont le pouvoir augmente considérablement (de 6 à 67) chez l'écrevisse qui vient de muer.

12° Pendant toute la période de mue qui s'étend, chez l'Astacus, de mai en septembre (première mue, mai-juin; deuxième mue, août-septembre), des essais d'immunisation pourraient conduire à des résultats erronés, car le métabolisme de la majorité des substances qui entrent dans la composition du plasma (protéines coagulables par la chaleur, lipides, sels de calcium) subit à ce moment des modifications considérables.

13° Le plasma des crabes sacculinés est plus riche en protéines coagulables par la chaleur que le plasma des crabes normaux. Cette augmentation porte surtout sur la fraction pseudo-globulines qui s'élève de 0,31 à 2,32 % chez les animaux éloignés de la mue; de 2,13 à 3,90 chez ceux qui sont en période de mue.

14° Le plasma des écrevisses qui consolident leur nouvelle carapace acquiert périodiquement la propriété de troubler une solution de chlorure de calcium *in vitro*. Un phénomène analogue, bien que beaucoup plus atténué, s'observe chez les mammifères en train de consolider une fracture quelconque. Ce phénomène est très vraisemblablement lié à l'apparition momentanée d'un ferment thermolabile qui précipite les sels de calcium (affaiblissement de ce pouvoir par le chauffage à 55°).

L'étude cytologique du tégument chez les écrevisses en train de muer permet de saisir la voie suivie par les sels de Ca qui cheminent, à partir du sang, pour trouver les cellules épidermiques, et parviennent par un mécanisme décrit au cours de ce travail jusque dans la cuticule chitineuse, où leur précipitation s'opère au contact du ferment précipitant.

BIBLIOGRAPHIE

Arthus : « Recherches sur la coagulation du sang. » (*Thèse*, Paris, 1890.)

Baglioni : « Einige Daten zur Kenntnis der quantitativen Zusammensetzung verschiedener Körperflussigkeiten von Seetieren (Fischen und einigen Wirbellosen). » (*Hofmeisters Beiträge*, 1906, IX, 50; cité d'après Winterstein.)

Bénédict : *Journ. of Biology*, 1922, LI, 187 ; LIV, 233 ; 1925, LXIV, 215.

Blanchetière (A.) : « Sur une méthode du dosage du sodium. » (*Bull. de la Soc. chimique de France*, 1923, XXXIII, 807.)

Botazzi (F.) : « La pression osmotique du sang des animaux marins. » (*Arch. ital. de Biol.*, 1897, XXVIII, 61-66.)

Browinsky : « Soufre neutre et oxydé dans le sang. » (*Bull. de la Soc. de Chimie biologique*, 1924, VI, 352.)

Canals (M.-E.) : « Du dosage du calcium et du magnésium dans différents milieux salins. » (*Bull. de la Soc. chimique de France*, 1918, XXIII, 422.)

Cantacuzène (J.) : « Formation d'hémolysines dans le sérum des *Maïas squinado* inoculés avec des hématies de mammifères. » (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, LXXIII, 151-152.)

Id. : « Existence dans le sérum d'une substance antagoniste qui empêche ou retarde l'hémolyse. » (*Ibid.*, 1921, LXXXV, 970.)

Id. : « Cytolysines et cyto-agglutinines provoquées par l'inoculation du liquide cavitaire de Siponculus nudus chez *Maïa squinado*. » (*Ibid.*, 1923, LXXXIX, 266.)

Id. : « Observations relatives à certaines propriétés du sang de Carcinus mænas parasité par la sacculine. » (*Ibid.*, 1912, LXXIV, 109.)

Id. : « Sur la production d'anticorps chez Eupagurus prideauxi. » (*Ibid.*, 1913, LXXIV, 293.)

Chahowitch : « Contribution à l'étude de l'immunité chez les crustacés décapodes. Effets de l'action des cellules microbiennes *in vivo*. Existence d'une immunité naturelle antitoxique chez les crustacés décapodes. » (*Annales Soc. Lyon*, 1924, LXX, 96; cité d'après J. Cantacuzène: « Immunité chez les invertébrés. »)

Clark : *The determination of Hydrogen ions*, 1925, seconde édition, Williams et Wilkins.

Cracium (E.): « Die Heparin plasma Methode für Gewebekulturen. » (*Archiv. für exp. Zellforschung*, 1926, II.)

Damboviceanu (A.) : « Quelques recherches sur les propriétés agglutinantes et précipitantes du sang d'Anodonta cyanea. » (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, XCI, 276.)

Id. : « Sur les caractères physico-chimiques du sang de l'Anodonte. » (*Ibid.*, 1924, XCI, 739.)

Id. : « Recherches sur quelques constituants physico-chimiques du sang d'Hélix pomatia. » (*Ibid.*, 1923, LXXXIX, 2, 261.)

Id. : « Détermination de certains constituants du plasma de Sipunculus Nudus au cours de l'immunisation. » (*Ibid.*, 1926 XCV, 2, 115.)

Id. : « Variations des substances protéiques coagulables par la chaleur dans le plasma des Carcinus mænas normaux et sacculinés. » (*Ibid.*, 1928, XCVIII, 1, 1633.)

Id. : « Modifications physico-chimiques du plasma d'Astacus fluviatilis au moment de la mue. » (*Ibid.*, 1929, C, 900.)

Delaunay (H.) : « Sur l'azote restant du sang et du liquide cavitaire de quelques invertébrés. » (*Ibid.*, 1912, LXXIII, 492.)

Id. : « Sur l'azote restant du sang et du liquide cavitaire de quelques invertébrés. » (*Ibid.*, 1913, LXXIV, 151.)

Dohrn (A.) « Analectam ad historiam naturalem Astaci fluviatilis. » (Cité d'après Winterstein : *Handbuch der vergleichender Physiologie*, I, I. te Hfte.)

Duval (M.) : « Recherches physico-chimiques et physiologiques sur le milieu intérieur des animaux aquatiques. » (*Am. Inst. Océanographie*, 1925, II, 233.)

Fauré-Fremiiet et Nichita (G.) : « Charge électrique et agglutination chez les amibocytes d'invertébrés marins. » (*Ann. de Physiol. et de Physico-Chimie biol.*, 1927, 247.)

Fontes-Thivolle : *Bull. Soc. de Chimie biol.*, 1921, III, 226.

Fosse : *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1916, XXX, 523.

Fredericq (Léon) : « Note sur le sang du Homard. » (*Bull. de l'Acad. royale de Belgique*, 1879, XLVII, 409.)

Freudenberg (E.) et Gyorgy (P.) : « Der verkalkungsvorgang bei der Entwicklung des Knochens. » (*Biochemische Zeitschr.*, 1924, CXLVII, 195.)

Gassmann (Th.) : « Chemische Untersüchungen von gesunden und rachitischen Knochen. » (*Hoppe-Seylers Z.*, 1910, LXX, 161 ; 1913, LXXXIII, 403.)

Gautrelet : « Sur les formes élémentaires du P chez les invertébrés. » *C. R.*, 1902, CXXXIV, 186.)

Griesbach (H.) : « Beitrag zur Kenntnis des Blutes. » (*Pflüg. Arch.*, 1891, L, 473.)

Griffits : « On the blood of invertebrates. » (*Proc. Royal Soc. Edimburg*, 1890-1891, XVIII, 298; cité d'après Winterstein.)

Guyot : *Paris médical*, 1931 ; relaté par Perrault.

Hagedorn-Jensen : *Biochemische Zeitschrift*, 1923, CXXXV, 46, et CXXXVII, 92.

Halliburton (W.) : « On the blood of decapod crustacea. » (*Journ. de Physiol.*, 1885, VI ; cité d'après Winterstein : *Handbuch der vergleichenden Physiologie*, Bd. I, I. te Hfte.)

Heim : « Etude sur le sang des crustacés décapodes. » (*Thèse* ; citée d'après Winterstein.)

Hofmeister : « Ueber Ablagerungen und Resorbtion von Kalksaltzen in den Geweben. » (*Erg. Phys.*, 1910, X, 429.)

Howard-Brown (J.) : « The colorimetric determination of the H ions concentration of small amount of fluid. » (*Journ. Laborat. and clinic. Medic.*, 1924, IX.)

Imbert : *Presse médicale*, 1931, vol. I, 403.

Javillier et Djelatides : « Sur une méthode de microdosage volumétrique du phosphore et son application à l'analyse biologique. » (*Bull. de la Soc. de Chimie biol.*, 1928, X, 342.)

Klement (R.) : « Die Zusammensetzung der Knochenstützsubstantz. » (*Hoope-Seylers Z.*, 1929, CLXXXIV, 132.)

Klinke (K.) : « Neuere Ergebnisse der Calciumforschung. » (*Erg. der Physiol.*, 1928, XXVI, 235.)

Kramer-Tisdall : « A chemical method for the quantitative determination of potassium in small amounts of serum. » (*Journ. of Biol. Chem.*, 1921, XLVI, 339.)

Krugenberg (Ch.) : « Zur vergleichenden Physiologie der Lymphe, der Hydro und Haemolymphe. » (*Vergleichende physiol. Studien* ; cité d'après Winterstein.)

Id. : « Zur Kenntnis des Hämocyanine und seiner Verbreitung im Tierreiche. » (*Centralblatt f. die Med. Wissenschaft*, 1880, 418; cité d'après Winterstein.)
Laudat : *Thèse*, 1920.
Lévy (R.) : « Sur la toxicité des tissus de la sacculine vis-à-vis du crabe (Carcinus mænas) et sur la recherche des réactions d'immunité chez ce dernier. » (*Bull. Soc. Zool. Paris*, 1923, XLIII, 291.)
Id. : « Sur la constatation des différences d'ordre physico-chimique entre le sérum des crabes sacculinés et celui des crabes normaux. » *Bull. Soc. Zool. Paris*, 1924, XLIX, 333.)
Lichtwitz : « Ueber die Bedeutung der Kolloide für die Konkrementbildung und die Verkalkung. » (*Deutsche Med. Wochenschr.*, 1910.)
Loeb (Leo) : « Ueber die Blutgerinnung bei Wirbellosen. » (*Biochem. Zeit.*, 1910, XXIV, 478.)
Maquenne (M.-L.) : « Sur le dosage de très petites quantités de fer. » (*Bull. de la Soc. chim. de France*, XXIX, 1921, 585.)
Meyer (Horste) : *Jahrb. f. Kinderk.*, 1931, CXXXI, 203.
Michaelis (L.) : *Praktikum der physikalischen Chemie*, 1921, Julius Springer, Berlin.
Nolf (P.) : « Contribution à l'étude du sang des crustacés. » (*Arch. intern. de Physiol.*, 1909, VII, 411.)
Id. : « Contribution à l'étude du sang des crustacés. » (*Ibid.*, 280.)
Id. : « Contribution à l'étude du sang des crustacés. » (*Ibid.*, 379.)
Pauli (W.) et Samec (M.) : « Löslikhkeitsbeeinflussung von Elektrolyten durch Eiweisskörper. » (*Biochem. Zeit.*, 1903, XVII, 235.)
Pfaundler : *Jahrb. für Kinderheilkunde*, 1903, LX, 123.
Piettre et Villa : *C. R. Acad. des Sciences*, 1920, CLXX, 1372 et 1466.
Id. : *Ibid.*, CLXXII, 1051.
Robison (R.) et Soames (K.-M.) : « The possible significance of hexose phosphoric sters in ossification. » (*Biochem. Journ.*, 1924, XVIII, 740, 755.)
Schwartz (R.), Eden (R.) et Hermann (R.) : « Chemischer Ablauf und Beeinflussung von Frakturheilungen. » (*Biochem. Zeitschr.*, 1924, CXLIX, 100.)
Schönheimer (R.) et Oshima (F.) : « Der Kupfergehalt normalen und pathologischer Organe. » (*Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1929, CLXXX, 249.)
Tait (John) : « Type of crustacea blood coagulation. » (*Journ. of the Marine Biol. Assoc.*, 1911, IX, 19; cité d'après Winterstein.)
Tait (J.) et Gunn (J.) : « The blood of Astacus fluviatilis, a study in crustacea blood, with special referrence to coagulation and phagocytosis. » (*Q. J. Exp. Physiol.*, 1918, XII, 35.)
Todd (Charles) : « On the electrical behaviour of bacteriophage. » (*Brit. Journ. of Exp. Pathol.*, 1927, VIII, 369.)
Verne (J.) : « Les pigments tégumentaires chez les crustacés décapodes. » (*Archives de Morphologie générale*, 1923.)
Id. : *Les pigments dans l'organisme animal.* Encyclopédie scientifique, G. Doin, Paris.
Waard (J. de) : « Eine Mikrobestimmung des Calciums in Blutserum und andere organischen Substanzen. » (*Biochem. Zeit.*, 1919, XCVII, 176.)
Wells (H.-G.) : « Pathological calcification. » (*Journ. med. Research.*, 1905-1906, XIV, 491.)
Wigglesworth (Clarke) et Walter Calhonn (Wheller) : *The inorganic constituens of marin invertebrates*, Washington, 1922.
Witting : « Ueber das Blut einiger Crustaceen und Molusken. » (*Jahrb. für prakt. Chemie*, 1858, LXXIII, 123; cité d'après Winterstein.)

DEUXIÈME THÈSE

QUESTIONS POSÉES PAR LA FACULTÉ

I. — L'immunité humorale chez les Invertébrés.

II. — La constitution de l'Hémoglobine.

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 3 mai 1932.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Signé : E. ROTHÉ.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 4 mai 1932.

Le Recteur de l'Académie,
Signé : J. DRESCH.

Niort. — Imp. Th. Martin.